

## THESIS / THÈSE

### MASTER IN BIOLOGY

### Recherche de partenaires de l'hyaluronidase Hyal2

Jadin, Laurence

*Award date:*  
2003

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

**Faculté des Sciences**

**RECHERCHE DE PARTENAIRES DE L'HYALURONIDASE HYAL2**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Laurence JADIN  
Juin 2003

# INTRODUCTION

Le Laboratoire de physiologie et pharmacologie s'intéresse depuis plusieurs années à l'hyaluronidase hyal2 dont les fonctions restent très mal connues. Le but du présent travail est de rechercher des interactions entre l'hyaluronidase hyal2 et d'autres protéines cellulaires, en se servant d'une forme purifiée d'hyal2 de rat. Cette introduction portera donc successivement sur les hyaluronidases et plus particulièrement hyal2, sur les techniques de production et purification de protéines recombinantes et sur les approches permettant la mise en évidence d'interactions entre protéines.

## A. L'HYALURONANE ET LES HYALURONIDASES

### 1. L'ACIDE HYALURONIQUE OU HYALURONANE

#### 1.1. Structure

L'acide hyaluronique ou hyaluronane est un polysaccharide anionique linéaire formé d'une succession d'unités disaccharidiques composées d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine reliés entre eux en alternance par des liens osidiques  $\beta(1-3)$  et  $\beta(1-4)$  (**figure 1.1**). Il est le plus souvent libre, non associé à des protéines, et peut être d'une taille impressionnante ( $> 10^6$  Da).

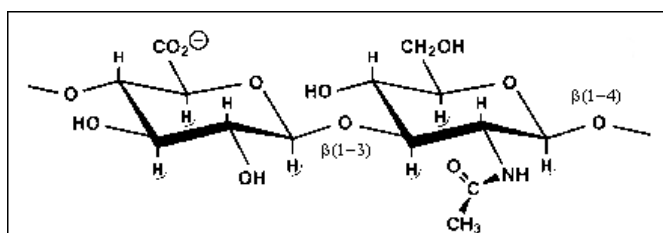


Figure 1.1

Représentation de l'unité disaccharidique de base de l'hyaluronane. Il s'agit d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine reliés entre eux par des liaisons  $\beta(1-3)$  et  $\beta(1-4)$ .

## 1.2. Historique

C'est en 1934 que l'acide hyaluronique fut pour la première fois décrit par Karl Meyer (Meyer & Palmer, 1934). Le nom attribué à la molécule provient de la fusion des termes "hyaloïde" et "acide uronique". Le premier fait référence au tissu à partir duquel la molécule avait été isolée, c'est-à-dire l'humeur vitrée (hyaloïde) de l'œil de bœuf. Le choix du second terme repose tout simplement sur la mise en évidence par Meyer de la présence d'acide uronique au sein du polysaccharide. Le terme d'hyaluronane, maintenant privilégié, dénonce le fait que la molécule existe *in vivo* sous la forme d'un polyanion et non sous sa forme acide protonée, et témoigne de son appartenance aux glycosaminoglycanes (Laurent & Fraser, 1992).

## 1.3. Localisation chez les mammifères

L'hyaluronane est présent à l'intérieur de l'organisme en de nombreux endroits et sous des formes diverses (Laurent & Fraser, 1992; Lee & Spicer, 2000): en libre circulation dans le plasma, lâchement associé à des protéines de la matrice extracellulaire, fermement associé à la cellule via une variété de récepteurs, mais aussi à l'intérieur de la cellule, que ce soit dans le noyau ou dans le cytoplasme. Il est le constituant majoritaire d'un certain nombre de tissus, notamment de l'humeur vitrée (0,1-0,4 mg/ml), du liquide synovial (3-4 mg/ml) ou encore de la matrice entourant l'ovocyte (~0,5 mg/ml).

## 1.4. Fonctions

Commenté [A1]: trouver ref globale sur l'HA

L'hyaluronane, à la fois composant structurel et molécule de signalisation, possède de nombreux rôles *in vivo*. Il a été observé que ses taux circulants augmentaient en cas de réponse au stress aigu, de choc, de septicémie, de brûlure étendue et d'infection. Une augmentation du taux d'hyaluronane est également observée dans certains tissus en cas d'inflammation, d'œdème, de cancer, de blessure, etc. Il semble que certaines de ses propriétés soient fonction de sa taille. Par exemple, il peut inhiber ou stimuler l'angiogenèse selon que son poids moléculaire dépasse ou non 20 kDa (West & Kumar, 1989; Lee & Spicer, 2000). Des fragments plus petits apparaissent en cas d'inflammation (Dahl *et al.*, 1985; Laurent & Fraser, 1992; Lee & Spicer, 2000). Ceci permet de présumer de l'importance des hyaluronidases, enzymes dont la fonction est le clivage de l'hyaluronane.

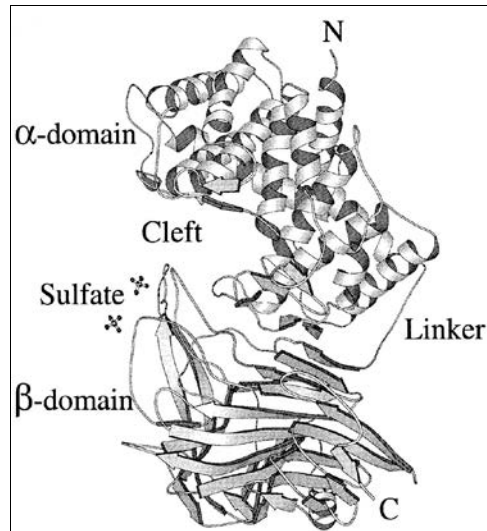
## 2. LES HYALURONIDASES: VUE D'ENSEMBLE

### 2.1. Historique et classification

La dégradation de l'hyaluronane est assurée par une série d'enzymes appelées hyaluronidases. Celles-ci sont représentées chez de nombreuses espèces vivantes, des

bactéries aux mammifères, en passant par certains champignons, insectes et autres organismes. L'activité hyaluronidasique a initialement été mise en évidence sous la forme d'un "spreading factor" (agent de diffusion). Duran-Reynals, en 1928, a en effet identifié au sein d'extraits testiculaires de mammifères la présence d'un agent favorisant la propagation des virus et toxines par voie sous-cutanée (Duran-Reynals, 1928). L'appellation "hyaluronidase", quant à elle, date de 1939 et revient à Chain et Duthie, soucieux de qualifier ainsi les enzymes dégradant l'hyaluronane (Chain & Duthie, 1939). Ils en ont d'ailleurs proposé une classification relativement précise, les distinguant en trois catégories.

- ✦ La première catégorie regroupe les hyaluronidases de mammifères et de nombreux autres eucaryotes. Ce sont des endo- $\beta$ -N-acétylhexosaminidases qui dégradent l'hyaluronane en le clivant au niveau de liaisons  $\beta(1-4)$  par un processus d'hydrolyse. Les produits finaux sont majoritairement des tétra- et des hexasaccharides. Ces enzymes participent également dans une certaine mesure au catabolisme des chondroïtines sulfate et du dermatan sulfate. Elles présentent en outre une activité de transglycosylation leur permettant de générer des molécules hybrides.
- ✦ Les hyaluronidases bactériennes, formant une deuxième catégorie, sont également des endo- $\beta$ -N-acétylhexosaminidases qui dégradent l'hyaluronane, le dermatan sulfate et certaines chondroïtines sulfates. Elles clivent aussi le lien  $\beta(1-4)$  mais le font par un mécanisme de désaturation ou  $\beta$ -élimination. Ce sont des lyases, contrairement aux enzymes de la première catégorie qui sont des hydrolases. Deux hyaluronate-lyases de streptocoque ont récemment été cristallisées (**figure 1.2**) et leur structure tridimensionnelle aux rayons X a été élucidée, révélant un site d'action en forme de fente compris entre deux domaines globuleux (Li *et al.*, 2000). Chez les bactéries, les hyaluronidases sont importantes en tant qu'éléments de virulence puisqu'elles permettent une meilleure dissémination des micro-organismes à l'intérieur de l'hôte infecté par digestion des matrices extracellulaires, riches en hyaluronane (Frost *et al.*, 1996). Le génome de *Clostridium perfringens*, par exemple, contient plusieurs hyaluronidases (Shimizu *et al.*, 2002).



**Figure 1.2**

Schéma de la structure d'une hyaluronate lyase de Streptocoque. Deux domaines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont séparés par une fente (cleft) (tiré de Li et al., 2000).

- ✦ Le dernier groupe représente les hyaluronidases de certains parasites et de crustacés. Ce sont des endo- $\beta$ -glucuronidases clivant les liens  $\beta(1-3)$  par hydrolyse. Les produits finaux sont des tétra- et hexasaccharides à extrémité non réduite. Ces enzymes faciliteraient la pénétration de ces parasites au travers de la peau de leur hôte (Hotez *et al.*, 1994).

## 2.2. Hyaluronidases eucaryotes

L'hyaluronidase contenue dans le venin d'abeille est la première hyaluronidase eucaryote dont la structure ait pu être déterminée (Gmachl & Kreil, 1993). Elle agit comme "spreading factor" en permettant la dissémination du venin après une piqûre. Par la suite, il s'est avéré qu'un polypeptide localisé au niveau de la tête du spermatozoïde, dénommé PH-20 ou SPAM1, lui était relativement homologue. Une activité hyaluronidasique a pu d'ailleurs être ultérieurement attribuée à PH-20 (Hunnicut *et al.*, 1996; Cherr *et al.*, 2001). Cette protéine est impliquée dans la pénétration du spermatozoïde à travers la matrice entourant l'ovocyte, préalablement à la fécondation (Primakoff *et al.*, 1985).

Les EST et certaines séquences déposées dans les banques de données ont permis la découverte de cinq autres gènes présentant de fortes homologues de séquence et baptisés hyal1, hyal2, hyal3, hyal4 et hyalp1 (Csoka *et al.*, 2001). Les quatre premiers codent pour des protéines fonctionnelles du même nom. Le dernier se trouve être chez l'homme un pseudogène tandis que son homologue chez la souris semble toujours actif.

### 2.3. Organisation génomique des hyaluronidases

Au niveau génomique, les six gènes des hyaluronidases sont organisés en deux groupes de trois (Csoka *et al.*, 2001). Chez l'homme, le premier groupe est localisé sur le chromosome 3 en position p21.3 et est constitué des gènes *hyal1*, *hyal2* et *hyal3*. Ces gènes sont également connus sous le nom de Luca-1, -2 et -3. Cette appellation, dérivant des termes "lung carcinoma", trouve son origine dans le fait que certains cancers pulmonaires à petites cellules sont associés à une délétion de cette région (Daly *et al.*, 1993), ce qui suggère l'existence en ce locus d'un ou plusieurs gènes à effet suppresseur de tumeur. L'identité de ce ou ces gènes n'a pas encore pu être déterminée, mais un intérêt supplémentaire dans l'étude des hyaluronidases peut ici être perçu. L'autre groupe de gènes, situé chez l'homme sur le chromosome 7 dans la région q31.3, comprend *hyal4* et PH-20 ainsi que le pseudogène *hyalp1*. L'organisation génomique des gènes d'hyaluronidases est semblable chez la souris (Czoka *et al.*, 1998). Les deux chromosomes murins concernés sont le 9 et le 6.

Cette organisation génomique particulière est vraisemblablement le reflet de deux duplications. La première, survenue à partir d'un gène d'origine, s'est soldée par l'apparition de deux nouveaux exemplaires du même gène. La deuxième fut une duplication en bloc de ce groupe de trois gènes. Le degré d'homologie entre les orthologues homme-souris est plus important qu'entre les six paralogues humains et révèle ainsi que ces duplications, suivies de la divergence entre les paralogues, ont dû survenir longtemps avant la divergence entre l'homme et la souris.

Ce mémoire explorant essentiellement *hyal2*, cette protéine sera abordée en détail après une brève description des autres hyaluronidases de mammifères.

## 3. APERÇU DES HYALURONIDASES DE MAMMIFÈRES

### 3.1. Hyal1

*Hyal1* est une hyaluronidase plasmatique active à pH acide. Elle fut la première hyaluronidase purifiée à partir des tissus somatiques de mammifères (Frost *et al.*, 1997). Son ARNm se trouve en majorité dans les organes parenchymateux comme le foie, les reins, la rate ou le cœur. L'urine contient également énormément d'*hyal1*. Une activité spécifique cent fois supérieure à celle du plasma y est observée. Une seconde forme de la protéine y a également été découverte.

Une déficience congénitale en *hyal1* est connue et référée en tant que "mucopolysaccharidose IX" (Natowicz *et al.*, 1996; Triggs-Raine *et al.*, 1999). Le phénotype comprend un retard de croissance, le développement de masses péri- et intra-articulaires qui gonflent par moment de manière douloureuse, ainsi qu'un épaissement de la peau.

*Hyal1*, l'hyaluronidase circulante prédominante, a été étudiée dans le cadre de la transformation maligne. L'hyaluronane et les hyaluronidases sont en effet impliqués dans les processus de cancérisation des cellules et dans la prolifération tumorale. Certaines tumeurs présentent un taux d'hyaluronane proportionnel à leur pouvoir métastatique, alors que

l'hyaluronidase peut, quant à elle, être responsable d'une suppression de la progression tumorale (Csoka *et al.*, 2001). Par contre, d'autres tumeurs sont caractérisées par le fait que l'expression des hyaluronidases, en particulier d'hyal1, représenterait un critère de gravité (Posey *et al.*, 2003). Ces données à première vue contradictoires pourraient être expliquées par le fait que l'hyaluronane et les hyaluronidases seraient tous deux requis dans le processus de transformation maligne, mais interviendraient à des moments différents.

### **3.2. PH-20**

Le sperme de mammifère contient une hyaluronidase connue sous le nom de PH-20 ou SPAM1. Il s'agit d'une protéine localisée sur la tête du spermatozoïde et sur la membrane interne de l'acrosome, où elle semble exister sous une forme biochimiquement différente de celle se trouvant à la membrane plasmique. PH-20 est indispensable pour que le spermatozoïde puisse traverser le cumulus oophorus, tissu riche en hyaluronane entourant l'ovocyte, afin d'aller féconder ce dernier (Primakoff *et al.*, 1985; Hunnicutt *et al.*, 1996).

PH-20 possède différentes fonctions: elle est à la fois une hyaluronidase, un récepteur impliqué dans la réponse cellulaire à l'hyaluronane ainsi qu'un récepteur pour la zone pellucide qui entoure l'ovocyte (Cherr *et al.*, 2001). Elle est fixée à la membrane par une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). La forme localisée au niveau de la membrane externe n'exhibe une activité qu'à pH neutre. Celle de la membrane acrosomale interne, quant à elle, présente la particularité d'être active à pH acide et neutre. Ces deux activités font vraisemblablement intervenir deux domaines différents de la protéine (Yudin *et al.*, 2001).

### **3.3. Hyal3**

Hyal3 est encore mal connue. Son ARNm se retrouve essentiellement dans les testicules et dans la moelle, deux tissus caractérisés par la persistance de cellules souches tout au long de la vie. Hyal3 pourrait dès lors être impliquée dans la régulation de ces cellules souches (Csoka *et al.*, 2001). C'est une protéine très conservée entre l'homme et la souris. Sa fonction, que l'on ignore encore, pourrait donc se révéler très importante.

### **3.4. Hyal4**

Hyal4 est exprimée dans le placenta et dans le muscle strié squelettique. Cette enzyme, catégorisée en tant qu'hyaluronidase, serait en fait une chondroïtinase sans activité hyaluronidasique. Si tel était effectivement le cas, elle serait la première chondroïtinase identifiée chez les vertébrés (Csoka *et al.*, 1999).

### **3.5. Hyalp1**

Hyalp1 est, chez l'homme, un pseudogène. Deux délétions entraînent l'apparition de codons de terminaison prématurée (Csoka *et al.*, 1999). Son homologue murin, par contre, ne



contient aucune mutation. Il pourrait dès lors constituer, chez la souris et peut-être chez d'autres espèces, un gène encore bel et bien actif (Csoka *et al.*, 2001).

#### 4. *HYAL2*

##### 4.1. Introduction

Après la découverte des premières hyaluronidases eucaryotes, en l'occurrence celles du venin d'abeille et du spermatozoïde, les EST permirent la mise en évidence d'autres gènes codant pour des protéines apparentées, dont *hyal2*. Alors que le Laboratoire de physiologie et pharmacologie avait cloné *hyal2* par criblage d'une banque d'ADNc de rein de rat (Flamion *et al.*, 1998), une équipe autrichienne publiait les premiers résultats de son étude d'*hyal2* murine et humaine (Lepperdinger *et al.*, 1998), portant essentiellement sur l'expression, l'activité enzymatique et la localisation de la protéine.

##### 4.2. Localisation

Les premiers résultats quant à la localisation d'*hyal2* ont incité l'équipe de Lepperdinger à penser qu'il s'agissait d'une enzyme lysosomale (Lepperdinger *et al.*, 1998). Ces auteurs ont effectivement mis en évidence une activité enzymatique maximale à pH acide. Cet élément a été confirmé dans le Laboratoire de physiologie et pharmacologie. Ensuite, Lepperdinger *et al.* ont visualisé en microscopie à fluorescence une construction *hyal2*-GFP. Elle montrait une colocalisation de la protéine avec le Lysotracker Red, un fluorophore s'accumulant dans les vésicules acides. Toutefois, les études ultérieures ont fortement ébranlé la théorie de l'appartenance lysosomale d'*hyal2*. Ainsi, l'analyse bioinformatique de la séquence d'*hyal2* prédit une ancre GPI C-terminale (Van Moer, 2002), peu concevable pour une protéine lysosomale. Plusieurs données expérimentales récemment publiées tendent à conforter l'idée d'une localisation membranaire d'*hyal2*.

Premièrement, l'expression d'*hyal2* de *Xenopus laevis* dans des fibroblastes déficients en récepteur au mannose-6-phosphate conduit à une distribution subcellulaire comparable à celle observée dans des cellules normales (Müllegger & Lepperdinger, 2002). Deux interprétations sont possibles: soit *hyal2* n'est pas une enzyme lysosomale, soit elle l'est mais n'y est pas acheminée via la voie classique du mannose-6-phosphate.

Deuxièmement, *hyal2* jouerait le rôle de récepteur, fort probablement membranaire, pour un virus ovin oncogène connu sous le nom de jaagsiekte sheep retrovirus ou JSRV (Rai *et al.*, 2001). Ces auteurs ont d'ailleurs démontré qu'une partie de la protéine *hyal2* se trouvait dans la fraction membranaire et pouvait être relarguée par clivage à la phospholipase C, phosphatidyl-inositol dépendante. Ce traitement l'inactive en tant que récepteur pour le virus JSRV. Le fait qu'*hyal2* serve de récepteur à un virus rend l'hypothèse d'une localisation extra-membranaire difficile à concevoir. Cette particularité d'*hyal2* de constituer un récepteur pour des particules virales sera approfondie plus loin.

Troisièmement, il est connu que les protéines à ancre GPI possèdent une séquence signal en position N-terminale. Or, le remplacement de cette séquence signal putative dans *hyal2* par un tag (aussi appelé balise) résulte en une localisation cytosolique de la protéine et une incapacité de celle-ci à induire la transduction du JSRV (Rai *et al.*, 2001). Ces données sont donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle la protéine serait localisée au moins en partie au niveau de la membrane plasmique, à laquelle elle serait liée par l'intermédiaire d'une ancre GPI tout comme, d'ailleurs, son homologue l'hyaluronidase de spermatozoïde PH-20.

#### 4.3. Activité

La présence d'une quelconque activité enzymatique d'*hyal2* vis-à-vis de l'hyaluronane reste difficile à démontrer, ce qui pose la question de savoir si elle existe réellement. Soutenue par les résultats de Lepperdinger *et al.* (1998), elle semblait contredite par ceux de Rai *et al.* (2001). Cette dernière équipe est cependant récemment revenue sur sa position en affirmant avoir bel et bien décelé une faible activité (Miller, 2003). En fait, contrairement à *hyal1* ou PH-20 par exemple, qui dégradent l'hyaluronane en tétra- ou hexasaccharides, l'activité d'*hyal2* ne permet pas d'obtenir des fragments d'une taille inférieure à environ 100 unités saccharidiques, ce qui correspond à un poids moléculaire de 20 kDa. Ces fragments pourraient être dotés de certaines fonctions biologiques particulières. Une activité pro-inflammatoire est notamment vraisemblable (Mertens-Strijthagen *et al.*, 2000).

Si l'on considère que finalement, *hyal2* est bien une protéine membranaire, comme un certain nombre de résultats incitent à le penser, l'acidité de son optimum de pH est difficilement explicable. On pourrait par exemple imaginer que le substrat se lie à l'enzyme à pH physiologique mais que l'hydrolyse ne commence qu'après transfert dans un compartiment acide. Ce ne sont là bien sûr que des spéculations qui attendent d'être confirmées.

**Commenté [A2]:** aller revoir si la liaison ha hyaluronidase a été étudiée

#### 4.4. Expression

Les analyses en Northern Blot détectent la présence d'ARNm correspondant à *hyal2* dans tous les tissus, le cerveau adulte représentant la seule exception (Flamion *et al.*, 1998; Lepperdinger *et al.*, 1998). En ce qui concerne les Western Blots, les mêmes résultats sont obtenus: un antisérum dirigé contre *hyal2* permet la mise en évidence d'une protéine d'une taille apparente de 60 kDa dans tous les tissus sauf, encore une fois, dans le cerveau adulte (Lepperdinger *et al.*, 1998). *Hyal2* est par contre fortement exprimée dans le cerveau embryonnaire. Après la naissance, une méthylation au niveau d'îlots CpG localisés dans la région 5' du gène rend celui-ci silencieux (Lepperdinger *et al.*, 2001). Ces informations suggèrent une implication d'*hyal2* dans le développement cérébral.

#### 4.5. Autres fonctions potentielles

*Hyal2* pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la prolifération tumorale. Comme mentionné précédemment, le gène d'*hyal2* se situe au sein d'une zone de 120 kb délétée dans certains cancers pulmonaires, ce qui suggère un effet suppresseur tumoral. Celui-

ci n'est cependant pas systématique. En effet, hyal2 a été surexprimée dans des cellules d'astrocytome murines qui, réimplantées à l'intérieur du cerveau de souris, ont conduit au développement de tumeurs plus invasives et plus vascularisées que des tumeurs générées par réimplantation de cellules d'astrocytome non transfectées (Novak *et al.*, 1999). Les mêmes cellules tumorales surexprimant hyal2 ou non ont été réimplantées dans le tissu sous-cutané. Dans ce cas, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les tumeurs issues de cellules transfectées et les contrôles. En résumé, selon cette étude, hyal2 faciliterait l'invasion dans la matrice extra-cellulaire du cerveau.

Le JSRV est un virus ovin ne possédant aucun oncogène connu mais dont les protéines d'enveloppe ont le pouvoir de transformer les fibroblastes de rat en cellules tumorales. Il provoque chez le mouton un cancer appelé carcinome pulmonaire ovin. Les tumeurs induites par le virus purifié apparaissent en une dizaine de jours. Le récepteur cellulaire médiant l'entrée du JSRV n'est autre qu'hyal2, identifié comme tel au moyen d'hybrides de radiation (Rai *et al.*, 2001). Les cancers induits par ce virus étant relativement similaires du point de vue morphologique aux carcinomes bronchiolo-alvéolaires chez l'homme, l'étude d'hyal2 dans ce cadre mériterait sans doute d'être approfondie. Il a par ailleurs été montré qu'un antisérum dirigé contre la protéine de capsid du JSRV réagissait de façon croisée avec certains adénocarcinomes pulmonaires humains alors qu'aucune réaction n'est observée avec des lignées cellulaires pulmonaires normales ou d'autres adénocarcinomes (De las Heras *et al.*, 2000).

Hyal2 sert aussi de récepteur à un autre virus ovin référé sous les noms de ONAV (Ovine Nasal Adenocarcinoma Virus) ou ENTV (Enzootic Nasal Tumor Virus) (Dirks *et al.*, 2002). Ce virus, similaire au JSRV, ne possède pas lui non plus d'oncogène connu mais est néanmoins capable d'induire des cancers épithéliaux nasaux. Il est curieux de constater que l'ENTV et le JSRV, s'ils infectent les cellules via le même récepteur, ne présentent pas la même spécificité tissulaire. L'explication de ce phénomène doit donc être cherchée à un autre niveau.

Hyal2 pourrait être impliquée dans le contrôle de l'apoptose (Chang, 2002). Cet auteur a montré que la transfection de fibroblastes murins par cette protéine augmentait leur sensibilité à la toxicité du TNF $\alpha$ . Il a également démontré un antagonisme fonctionnel entre hyal2 et le TGF- $\beta$ 1. La sensibilisation au TNF $\alpha$  aurait pour origine l'activation par hyal2 de la protéine proapoptotique WOX1, capable d'induire l'apoptose via p53 ou de manière indépendante. Selon Chang, l'induction de l'apoptose serait accompagnée d'un déplacement d'une partie des protéines hyal2 vers les mitochondries. Ces éléments restent à confirmer, mais ils vont dans le sens d'un effet anti-tumoral d'hyal2.

Jusqu'à présent, aucune déficience en hyal2 n'a été décrite, ce qui suggère que la présence de deux allèles mutés soit létale *in utero*. Il n'a d'ailleurs jamais été possible jusqu'ici de générer de souris knock-out homozygotes hyal2  $-/-$  (Lepperdinger *et al.*, 2001).

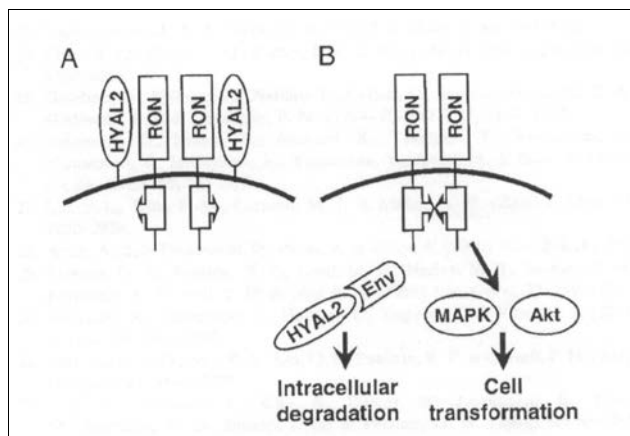
#### **4.6. Partenaires connus**

De nombreuses données indiquent que les protéines à ancre GPI sont impliquées dans la transduction du signal (Sharom & Lehto, 2002). Elles sont souvent associées à des protéines

attachées sur le feuillet cytoplasmique de la membrane plasmique comme celles de la famille Src ou des protéines kinases.

Jusqu'il y a peu, aucun partenaire n'était connu pour interagir avec hyal2. Des études récentes ont cependant permis de découvrir certaines interactions avec des protéines impliquées dans la transduction du signal.

Ainsi, hyal2 serait associée au récepteur tyrosine kinase RON (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003). Cette association permettrait de maintenir RON dans un état inactif. Les auteurs suggèrent, en s'appuyant sur cette interaction, un mécanisme qui pourrait expliquer le pouvoir oncogène du virus JSRV. L'infection par le virus provoquerait, via la protéine d'enveloppe env, la dissociation du complexe hyal2-RON, libérant RON qui se trouverait dès lors activée, allumant de cette manière la voie d'Akt et de MAPK conduisant à une stimulation de la prolifération et de la survie cellulaires (**figure 1.3**). La transformation maligne serait alors rendue possible. Les résultats de cette étude suggèrent donc que la protéine hyal2 posséderait une fonction anti-tumorale.



**Figure 1.3**

Schéma de l'interaction probable entre hyal2 et RON. A = en temps normal. B = infection par le virus JSRV provoquant par l'intermédiaire de la protéine d'enveloppe env la dissociation du complexe RON-hyal2, ce qui déclenche la voie de Akt et de MAPK aboutissant à la transformation (tiré de Danilkovitch-Miagkova et al., 2003).

De son côté, Chang suggère qu'il existe une interaction directe entre hyal2 et la protéine WOX1 impliquée dans la régulation de l'apoptose (Chang, 2002).

Par ailleurs, hyal2 contient probablement un domaine EGF-like (Van Moer, 2002). Les domaines EGF-like, comportant entre autres six résidus cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures, sont importants pour certaines interactions entre protéines. Ils se retrouvent souvent au niveau de protéines membranaires ou sécrétées, par exemple les sélectines, des facteurs de la coagulation, certaines protéines à ancre GPI, etc.

---

## B. PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES CHEZ LES PROCARYOTES

---

### 1. INTRODUCTION

L'étude d'une protéine est facilitée par l'obtention d'une forme purifiée de cette protéine. Pour ce faire, différentes techniques sont à la disposition des chercheurs. Elles utilisent, pour la production de protéines, des cellules procaryotes ou eucaryotes, chacune présentant des avantages et des inconvénients.

Il est possible d'induire chez *E. coli* la surexpression d'un gène donné (Makrides, 1996; Sambrook *et al.*, 1989). Pour ce faire, un plasmide obtenu par clonage d'un gène d'intérêt dans un vecteur particulier doit être introduit dans une souche appropriée. Il faut savoir que tous les gènes ne peuvent pas être exprimés efficacement chez *E. coli*, et cela pour des raisons qui ne sont d'ailleurs pas toujours entièrement claires, c'est pourquoi il est difficile de prédire quel gène sera ou ne sera pas correctement exprimé. Un certain type de structure au niveau du gène, une instabilité et une mauvaise efficacité de traduction de l'ARNm, une utilisation différente des codons, un problème de repliement, une dégradation ou encore une certaine toxicité de la protéine sont des facteurs qui pourraient empêcher l'expression.

L'inconvénient majeur des procaryotes est leur incapacité à effectuer la plupart des modifications post-traductionnelles réalisées par les eucaryotes. Ces modifications étant parfois indispensables à l'activité de la protéine, leur absence peut constituer un véritable problème. La formation des ponts disulfures peut elle aussi parfois se révéler problématique chez les procaryotes. De plus, il faut savoir que la production d'une protéine recombinante par les bactéries est le plus souvent intracytoplasmique, ce qui complique sa purification ultérieure. En outre, une surproduction de la protéine peut résulter en son entassement sous forme insoluble dans des corps d'inclusion. Les conditions de purification deviennent alors beaucoup plus contraignantes. Une solution serait de parvenir à la sécrétion de la protéine dans le milieu. Il n'existe cependant à l'heure actuelle aucun système universellement efficace en vue d'une telle production.

### 2. STRUCTURE D'UN VECTEUR D'EXPRESSION

Le choix du vecteur est un paramètre très important pour l'obtention d'une surexpression efficace. Différents éléments structuraux particuliers doivent y être présents. De tels vecteurs sont le plus souvent disponibles commercialement.

#### 2.1. Le promoteur

Les vecteurs d'expression sont pourvus d'un promoteur, placé en amont du gène à exprimer. Ce promoteur doit lui-même être sous le contrôle d'un gène de régulation qui peut soit être présent sur le vecteur lui-même, soit être intégré dans le génome de l'hôte.

Le promoteur doit présenter certaines caractéristiques. Premièrement, il doit être fort mais bien réprimé à l'état basal afin d'éviter la production de protéine toxiques à une culture bactérienne en l'absence d'induction. Ainsi, l'utilisation de systèmes ne permettant pas une répression complète peut être associée à une instabilité plasmidique, un ralentissement de la croissance et une diminution de la production de la protéine-cible. Les vecteurs les plus perfectionnés utilisent des promoteurs hybrides possédant, outre leur séquence promotrice forte, reconnue par un facteur activateur de la transcription, une séquence de reconnaissance pour un répresseur encodé généralement par le vecteur lui-même.

Deuxièmement, le promoteur doit pouvoir être interchangeable entre différentes souches d'*E. Coli*, afin d'éviter les changements de construction si l'utilisation d'une autre souche s'avère nécessaire.

Troisièmement, le promoteur doit permettre une induction aisée et peu coûteuse. Les méthodes les plus classiques utilisent l'induction thermique ou des agents chimiques tels que l'isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG), un analogue du lactose. Des systèmes plus récents sont basés sur l'induction au froid. A basse température, les taux de transcription et de traduction diminuent. La protéine, produite plus lentement, peut alors se replier plus facilement. Ces systèmes offrent l'avantage de limiter la formation de corps d'inclusion. Il existe toute une série de promoteurs inductibles par des moyens variés (**tableau 1.1**).

Promoteur	Regulation	Induction
<i>lac</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>lacI</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i>	IPTG
<i>trp</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>lacI</i> (Ts), <i>lacI<sup>q</sup></i> (Ts)	Thermique
<i>lpp</i> ( <i>E. coli</i> )		Privation de trp,
<i>phoA</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>phoB</i> (+), <i>phoR</i> (-)	acide indole acrylique
<i>recA</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>lexA</i>	IPTG, lactose
<i>araBAD</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>araC</i>	Privation de phosphate
<i>proU</i> ( <i>E. coli</i> )		Acide nalidixique
<i>cst-I</i> ( <i>E. coli</i> )		L-arabinose
<i>tetA</i> ( <i>E. coli</i> )		Osmolalité
<i>cadA</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>cadR</i>	Privation de glucose
<i>nar</i> ( <i>E. coli</i> )	<i>fnr</i>	Tétracycline
<i>tac</i> (hybrid, <i>E. coli</i> )	<i>lacI</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i>	pH
<i>trc</i> (hybrid, <i>E. coli</i> )	<i>lacI</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i>	Anaérobiose, nitrate
	<i>lacI</i> (Ts), <i>lacI<sup>q</sup></i> (Ts)	IPTG, thermique
<i>lpp-lac</i> (hybrid, <i>E. coli</i> )	<i>lacI</i>	IPTG
P <sub>syn</sub> (synthétique, <i>E. coli</i> )	<i>lacI</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i>	IPTG
Starvation promoters ( <i>E. coli</i> )		
P <sub>L</sub> (phage $\lambda$ )	$\lambda$ cIts857	Thermique
P <sub>L</sub> -9G-50 (mutant, phage $\lambda$ )		Froid (<20°C)
<i>cspA</i> ( <i>E. coli</i> )		Froid (<20°C)
P <sub>R</sub> , P <sub>L</sub> (tandem, phage $\lambda$ )	$\lambda$ cIts857	Thermique
T7 (phage T7)	$\lambda$ cIts857	Thermique

T7-lacO (phage T7)	<i>lacI<sup>q</sup></i>	IPTG
$\lambda P_L$ , $P_{T7}$ (tandem, phages $\lambda$ et T7)	$\lambda cIts857$ , <i>lacI<sup>q</sup></i>	Thermique, IPTG
T3-lacO (phage T3)	<i>lacI<sup>q</sup></i>	IPTG
T5-lacO (phage T5)	<i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>lacI</i>	IPTG
T4 gene 32 (phage T4)		Infection T4
<i>nprM-lacO</i> ( <i>Bacillus</i> spp.)	<i>lacI<sup>q</sup></i>	IPTG
VHb ( <i>Vitreoscilla</i> spp.)		Oxygène, cAMP-CAP (cyclic AMP-catabolite activator protein)
Protein A ( <i>Staphylococcus aureus</i> )		

**Tableau 1.1**

Promoteurs utilisés pour la surexpression de gènes chez *E. coli*. (D'après Makrides, 1996).  
*lacI*(Ts) et *lacI<sup>q</sup>*(Ts) sont des allèles mutés de *lacI*.

## 2.2. Initiation et terminaison

La rentabilité de la transcription et de la traduction peut être fortement influencée par les éléments situés de part et d'autre de la séquence codante d'un gène. La protéine ne peut être exprimée efficacement chez *E. coli* qu'à condition d'insérer dans le vecteur les sites d'initiation et de terminaison adéquats.

Le codon d'initiation ATG n'est pas suffisant pour garantir une production satisfaisante de la protéine recombinante. Il doit être précédé d'une séquence de Shine-Dalgarno qui prévient la formation, au niveau de l'ARNm, de structures secondaires éventuelles qui pourraient inhiber la traduction.

La présence d'un signal de terminaison de la transcription est également requise. En fait, chez les procaryotes, la terminaison s'effectue par deux mécanismes, l'un dépendant de la protéine Rho, l'autre dépendant d'un signal localisé au niveau du transcrit lui-même et responsable de l'apparition de structures secondaires particulières. Ces signaux de terminaison constituent des éléments indispensables du vecteur d'expression car ils stabilisent l'ARNm en le protégeant des exonucléases et ils évitent que la transcription ne continue jusqu'à rencontrer un autre promoteur dont la fonction serait ainsi diminuée. A ce sujet, il peut être intéressant de placer un signal de terminaison en amont du gène étudié afin de limiter les interférences potentielles avec la transcription d'autres séquences plasmidiques. Enfin, les signaux de terminaison augmentent la stabilité du plasmide en empêchant la transcription importune de la région de répllication.

## 2.3. Sélection et multiplication

Un gène codant pour un facteur de résistance à un antibiotique est indispensable pour permettre, en présence de cet antibiotique, le maintien du plasmide et la sélection des clones transformés.

Enfin, il est important de munir le vecteur d'une origine de réplication responsable du contrôle de la multiplication du plasmide et de sa transmission aux cellules filles, donc de son maintien.

### 3. SYSTEMES DE BALISAGE DES PROTEINES

L'étude des protéines nécessite généralement de pouvoir les purifier et/ou les détecter. La purification par chromatographie d'affinité consiste d'abord à créer une protéine recombinante résultant de la fusion entre une protéine d'intérêt et un polypeptide particulier appelé tag ou balise. De nombreux tags sont actuellement utilisés (**tableau 1.2**) (Terpe, 2003). Des vecteurs permettant la construction de protéines de fusion avec différents tags sont disponibles commercialement.

La purification par chromatographie d'affinité est un procédé de purification puissant, applicable à toute une série de protéines différentes. L'isolement de la protéine se déroule par association spécifique du tag avec une autre molécule souvent immobilisée sur une résine, alors que les autres constituants de l'homogénat cellulaire sont lavés et éliminés. Par après, si nécessaire, l'interaction peut être rompue et la protéine-cible récupérée. Les molécules servant à accrocher le tag peuvent être des anticorps, des substrats, des ions formant des liaisons avec des acides aminés chargés, d'autres protéines, etc. Les procédés d'élution varient d'un système à l'autre (**tableau 1.2**).

Les tags peuvent être de tailles diverses. Leur choix est fonction de la protéine elle-même, de ses propriétés physico-chimiques, mais aussi de son utilisation ultérieure. Les tags de petite taille (poly-histidine, poly-arginine, c-myc,...) n'interfèrent en général que peu avec la protéine d'intérêt. Les protéines recombinantes obtenues peuvent souvent être utilisées telles quelles, notamment pour la production d'anticorps. Les tags plus volumineux, comme la maltose-binding protein (MBP), ont, quant à eux, tendance à modifier les propriétés des protéines fusionnées. L'effet peut être bénéfique, il peut s'agir par exemple d'une solubilité accrue, mais ces tags doivent souvent être ultérieurement clivés.

A cet effet, les vecteurs proposés commercialement possèdent généralement un site de clivage permettant, par l'utilisation de protéases spécifiques, la récupération, après purification, de la protéine libérée de son tag. Les protéases utilisées sont souvent le facteur X ou la thrombine. Il convient bien sûr, préalablement à leur utilisation, de s'assurer de l'absence, à l'intérieur de la protéine cible, de sites consensus reconnus par l'enzyme utilisée.

Parmi les différents systèmes de production et de purification de protéines recombinantes chez les procaryotes, les systèmes faisant intervenir la Glutathione-S-transferase (GST) ou le Calmodulin-binding peptide (CBP), tous deux utilisés dans le cadre de ce mémoire, seront discutés plus loin (cf. Résultats).



Tag	Matrice	Conditions d'élution
Poly-Arg	Résine échangeuse de cations	Gradient de NaCl à pH alcalin
Poly-His	Ni <sup>+</sup> -NTA ou Co <sup>++</sup> -CMA	Imidazole ou pH acide
FLAG	Anticorps monoclonal	EDTA ou pH acide
Strep-tag II	Strep-tactine	Desthiobiotine
c-myc	Anticorps monoclonal	pH acide
Peptide S	Fragment S de la RNase A	Thiocyanate de guanidine, citrate, MgCl <sub>2</sub> , pH acide
HAT (Histidine Affinity Tag)	Co <sup>++</sup> -CMA	Imidazole ou pH acide
CBD (Cellulose-Binding Domain)	Cellulose	Guanidine, urée, ou éthylène glycol
CBP (Calmodulin-Binding Peptide)	Calmoduline	EGTA
SBP (Streptavidin-Binding Peptide)	Streptavidine	Biotine
Chitin-Binding Domain	Chitine	Dithiothréitol (DTT), β-mercaptoéthanol ou cystéine
GST (Glutathione S-Transferase)	Glutathion	Glutathion réduit
MBP (Maltose-Binding Protein)	Amylose	Maltose

**Tableau 1.2**  
Principaux tags d'affinité, matrice associée et conditions d'élution. (tiré de Terpe, 2003).

## C. ETUDE DES INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE

### 1. INTRODUCTION

Bien que l'ensemble du génome soit maintenant disponible dans les banques de données, seule une petite partie des gènes se voit attribuer une véritable fonction. C'est pourquoi les

efforts actuels se concentrent sur la caractérisation des différents gènes et de leurs produits (voir, p. ex, Reboul *et al.*, 2003).

Les protéines sont impliquées dans la plupart des activités biologiques des cellules et entretiennent souvent entre elles des relations plus ou moins étroites, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Les interactions peuvent être stables, les protéines impliquées formant alors un complexe, ou plutôt transitoires, par exemple dans le cas où l'un des partenaires est le substrat de l'autre. Les protéines impliquées dans la signalisation, dans la division cellulaire, certaines enzymes agissant sur des substrats protéiques, etc., s'associent, de manière stable ou transitoire, à d'autres protéines.

**Commenté [A3]:** Insérer référence du livre current protocols in protein science

L'étude des interactions protéiques est donc un outil puissant pour mieux en comprendre la fonction. Cette étude peut être réalisée par diverses techniques biochimiques, biophysiques ou de biologie moléculaire. Parmi toutes ces techniques, la plus documentée est sans doute le double hybride en levure.

Quelques-unes des approches les plus courantes vont être présentées dans les paragraphes qui suivent. Il en existe cependant beaucoup d'autres et de nombreux progrès sont continuellement réalisés dans le champ d'étude des interactions entre protéines, ajoutant de nouvelles techniques à celles qui sont déjà documentées.

## 2. DOUBLE HYBRIDE

Le double hybride en levure (Fields & Song, 1989) est basé sur le principe de fonctionnement d'un facteur de transcription dont domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'activation de la transcription peuvent être dissociés. Les domaines d'activation et de liaison, séparés l'un de l'autre, sont fusionnés à des protéines dont l'interaction éventuelle, recréant un facteur de transcription fonctionnel par rapprochement des deux domaines, est observée à travers l'expression d'un gène rapporteur.

Le système du double hybride est très efficace et a déjà rencontré de nombreux succès, notamment lors de criblages systématiques de protéomes (Boulton *et al.*, 2001). Il a également subi de nombreuses adaptations. Il présente néanmoins certaines limitations (Serebriiskii & Joung, 2002). D'abord, le taux de faux positifs obtenus par la technique est relativement important. Il découle notamment du fait que certaines protéines sont auto-activantes: elles sont capables en elles-mêmes d'induire l'expression du gène rapporteur. De plus, le double hybride classique n'est pas applicable à toutes les protéines. En effet, il exige que l'interaction se réalise dans l'environnement nucléaire, et il est déconseillé dans le cas de protéines membranaires insolubles.

Depuis peu est également décrit un système similaire chez la bactérie (Dove *et al.*, 1997; Joung, 2001), basé sur la construction de protéines hybrides fusionnées avec, d'une part, un domaine de liaison à l'ADN et, d'autre part, une sous-unité de l'ARN polymérase. De principe similaire au double hybride en levure, il peut constituer par rapport à ce dernier une alternative intéressante notamment par sa rapidité et sa facilité d'utilisation. Ses avantages résident dans le fait qu'il rend possible le criblage de banques de taille très importante par rapport à son analogue chez la levure ainsi que l'étude de protéines eucaryotes auto-activantes ou qui interagiraient éventuellement avec des protéines endogènes de la levure. Le principal

reproche à l'utilisation de cellules procaryotes concerne leurs lacunes dans la réalisation de modifications post-traductionnelles qui peuvent conditionner les interactions entre protéines. Cette limitation peut être outrepassée par l'utilisation de souches mutantes capables d'effectuer un certain nombre de modifications post-traductionnelles.

Le SRS (Son of Sevenless (SOS) Recruitment System) (Aronheim *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2001) est une méthode similaire au double hybride classique qui utilise la voie de transduction du signal faisant intervenir SOS et ras. L'interaction entre une protéine-appât myristoylée et l'un de ses partenaires fusionné à la protéine SOS recrute cette dernière à la membrane plasmique, lui permettant d'activer ras et toute la cascade de transduction qui s'ensuit. L'utilisation d'une souche mutante de levure capable de se développer à 37°C sous la dépendance de cette voie assure la sélection des clones qui sont le terrain d'une interaction. Dans le cas de ce "double hybride membranaire", les interactions ont lieu dans le cytoplasme, ce qui peut constituer un avantage certain par rapport au double hybride classique. La technique peut également être utilisée pour la démonstration d'interactions faisant intervenir des protéines auto-activantes dans le "double hybride nucléaire". En outre, elle se révèle particulièrement sensible. Sa limitation majeure réside dans le faible nombre de clones obtenus lors d'un **criblage**.

**Commenté [A4]:** aller voir ce qu'il veut exactement dire pas là

### 3. CO-IMMUNOPRECIPITATION

La co-immunoprécipitation repose sur le fait que de nombreuses associations de protéines *in vivo* sont maintenues *in vitro* si les cellules sont lysées dans des conditions non-dénaturantes. L'immunoprécipitat ainsi obtenu à partir d'un extrait cellulaire est généralement analysé par SDS-PAGE ou en gel à deux dimensions en conditions dénaturantes afin de séparer et de visualiser les différents constituants du complexe protéique.

La co-immunoprécipitation peut être utilisée pour confirmer une interaction soupçonnée, par exemple, lors d'un criblage en double hybride. Le partenaire peut alors être détecté par des méthodes immunologiques ou par marquage métabolique à la [<sup>35</sup>S]méthionine. Les anticorps utilisés pour la précipitation peuvent être dirigés contre une séquence interne à la protéine. La protéine peut aussi être produite sous forme recombinante, fusionnée à un tag reconnaissable par un anticorps commercial (c-Myc, FLAG,...) ou possédant une forte affinité pour des molécules immobilisées sur un support solide (GST, MBP,...). La protéine peut être identifiée en comparant sa carte peptidique obtenue après digestion par une protéase à la carte peptidique obtenue de la même manière pour des protéines connues.

Il est également possible, par la technique de co-immunoprécipitation, de découvrir de nouveaux partenaires protéiques. Ceux-ci sont identifiés par séquençage peptidique ou par spectrométrie de masse, mais cette voie est généralement laborieuse. De plus, la co-immunoprécipitation est incapable de mettre en évidence les interactions faibles ou transitoires. Son application la plus intéressante reste la confirmation d'associations établies par d'autres techniques d'identification de partenaires à large échelle.

#### 4. RECHERCHE DE PARTENAIRES PAR CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'EXPRESSION

Cette technique (Takayama & Reed, 1997; Stone, 1999; Einarson & Orlinik, 2002) est basée sur la détection d'interactions *in vitro* entre une protéine cible dont on recherche les partenaires et une banque de protéines immobilisées sur une membrane de nitrocellulose.

La banque est généralement clonée dans le phage  $\lambda$ , sous le contrôle d'un promoteur permettant son expression. Les phages  $\lambda$ gt11 (Sikela & Hahn, 1987; Skolnik *et al.*, 1991; Blackwood & Eisenman, 1991; Kaelin *et al.*, 1992; Blanas & Rutter, 1992; Shibata *et al.*, 1997),  $\lambda$ EXlox (Margolis *et al.*, 1992; Takayama *et al.*, 1995) et  $\lambda$ ZAP (Ron & Dressler, 1992; VanRenterghem *et al.*, 1998) sont les plus fréquemment utilisés pour ce type de criblage. La banque peut être construite, mais un certain nombre de banques sont disponibles commercialement, pour différentes espèces, tissus ou phases de développement.

Après inoculation au sein d'une souche d'*Escherichia coli* permissive, les phages induisent une lyse des bactéries infectées et relâchent les protéines encodées par les ADNc clonés au sein de leur génome. Ces protéines sont alors adsorbées et immobilisées sur des membranes de nitrocellulose.

Les membranes sont criblées à l'aide de la protéine-appât. La détection des interactions peut être réalisée au moyen d'anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt (Takayama *et al.*, 1995) ou contre un tag lui étant fusionné, et couplés à un système de détection colorimétrique (par exemple, la HRP). Il est également possible de marquer la protéine au moyen d'isotopes, comme l' $^{125}\text{I}$  (Sikela & Hahn, 1987; Blackwood & Eisenman, 1991) ou, plus classiquement, le  $^{32}\text{P}$  (Skolnik *et al.*, 1991; Blanas & Rutter, 1992; Margolis *et al.*, 1992; Ron & Dressler, 1992; Kaelin *et al.*, 1992; Shibata *et al.*, 1997; VanRenterghem *et al.*, 1998). A cet effet, certains vecteurs permettent la fusion de la protéine-cible avec un site de phosphorylation reconnu par la protéine kinase A ou PKA. Le marquage est obtenu par phosphorylation de cette protéine de fusion au moyen de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . La biotinylation suivie d'une détection au moyen de streptavidine conjuguée à la phosphatase alcaline est une autre alternative (Mayer *et al.*, 1991).

L'un des grands avantages du criblage de banques d'expressions est le lien direct existant entre le phénotype et le génotype permettant l'identification aisée des candidats. Par l'apposition préalable de repères sur les boîtes et les membranes, il est en effet possible de déterminer l'emplacement du clone exprimant le partenaire potentiel. Son ADN peut alors être directement analysé.

Le criblage d'une banque d'expression clonée dans le phage  $\lambda$  présente l'intérêt d'un bruit de fond moins important que certaines autres techniques comme le double hybride. Par contre, tout comme lui, il possède l'inconvénient d'être réalisé dans des organismes relativement primitifs qui ne peuvent procéder à toutes les modifications post-traductionnelles des cellules eucaryotes supérieures. De plus, l'immobilisation des protéines sur des membranes de nitrocellulose peut en altérer la conformation et faire disparaître les interactions basées sur leur structure tridimensionnelle.

Dans tous les cas, les interactions mises en évidence selon cette méthode doivent être confirmées par d'autres techniques. Il peut être par exemple utile de choisir une technique *in vivo* afin de s'assurer que l'interaction puisse également être observée à l'intérieur même des

cellules et ne résulte pas d'un artéfact lié aux conditions artificielles dans lesquelles est réalisé le criblage.

## 5. PHAGE DISPLAY

Le phage display est une autre méthode de détection d'interactions protéiques se basant sur l'utilisation des phages (Sidhu, 2000; Goodyear & Silverman, 2002). Dans ce cas-ci, les protéines d'intérêt sont fusionnées avec des protéines de l'enveloppe d'un phage filamentueux, le plus fréquemment le phage M13, de manière à ce qu'elles soient exposées vers l'extérieur. Le phage M13 exprime 5 protéines d'enveloppe différentes : PVIII, présente en des milliers d'exemplaires sur toute la longueur du virus, et PIII, PVI, PVII et PIX, en quelques exemplaires seulement, à l'une de ses extrémités (PIII et PVI d'un côté, PVII et PIX de l'autre). Les protéines de fusion avec la protéine PVIII sont produites en de nombreux exemplaires. Cependant, la taille des peptides pouvant être fusionnés est réduite, question d'encombrement stérique. Les protéines de fusion avec la protéine PIII, par contre, sont produites en nombre beaucoup plus limité, mais permettent la fusion de peptides plus imposants.

Au départ, les protéines de fusion étaient construites à partir du génome viral (Smith, 1985). Ce système imposait une limite de taille importante, les polypeptides trop gros, interférant avec la fonction des protéines d'enveloppe, n'étant exposés que faiblement. Depuis lors, le développement des phagemides a permis d'augmenter l'efficacité de la technique du phage display. Actuellement, les protéines d'intérêt sont fusionnées avec une protéine d'enveloppe encodée sur un phagemide, contenant une origine de réplication. Par la suite, l'infection des cellules avec un phage "helper", dont l'origine de réplication est atténuée, conduit à la production de virions exposant à leur surface la protéine hybride encodée par le phagemide. De cette manière, l'effet délétère des plus gros peptides est atténué par l'expression concomitante d'une certaine proportion de protéines d'enveloppe natives du phage "helper".

Il existe toute une série de variantes par rapport à la technique classique, utilisant différentes protéines d'enveloppe, différents phages (le phage  $\lambda$  et le phage T4 par exemple), mais aussi des virus eucaryotes.

Dans le phage display, les peptides exposés peuvent être construits artificiellement. Ce procédé autorise la conception de peptides possédant une affinité très forte pour une protéine donnée. C'est pourquoi le phage display est utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la mise au point d'agonistes ou antagonistes de récepteurs et autres drogues peptidiques.

## BUTS DU MEMOIRE

---

Les connaissances concernant hyal2 sont à l'heure actuelle encore précaires. L'objectif de ce travail est d'aider à la compréhension de la fonction d'hyal2 par la recherche de protéines avec lesquelles elle pourrait interagir. Cette étude est réalisée par criblage d'une banque d'expression d'ADNc d'embryon de souris clonée en phage  $\lambda$ gt11. Nous espérons ainsi d'une part contourner certaines difficultés liées à la présence d'un ancrage GPI et à une forte association membranaire d'hyal2 dans la cellule, et d'autre part rechercher des partenaires forts, résistants *in vitro*, de cette enzyme, dans un contexte, la période embryonnaire, où hyal2 est fort exprimée.

Dans une première étape, l'appât protéique servant au criblage doit être construit. Pour ce faire, l'ADNc d'hyal2 est cloné, sans la séquence encodant la partie C-terminale hydrophobe, dans un vecteur d'expression qui permette la production de la protéine chez *Escherichia coli*. Afin de pouvoir, par la suite, recourir à une purification par chromatographie d'affinité en une étape, nous avons opté pour un vecteur muni d'un tag d'affinité. De même, le vecteur choisi est porteur d'un site de phosphorylation reconnu par la PKA et d'un site permettant un clivage éventuel par la thrombine.

Dans un second temps, l'expression de la protéine recombinante est induite dans l'hôte bactérien. La protéine ainsi produite est purifiée. Cette étape requiert une certaine mise au point.

Une fois la protéine-appât purifiée, le criblage en lui-même peut être effectué. L'appât doit d'abord être marqué. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons opté pour un marquage au [ $^{32}$ P]. Celui-ci est incorporé à la protéine au niveau d'un site de reconnaissance pour la PKA encodé par le vecteur d'expression.

La banque de phage est ensuite criblée au moyen de l'appât phosphorylé et l'ADNc des clones positifs, c'est-à-dire ceux qui produisent une protéine s'accrochant à hyal2, est séquencé.

## MATERIEL ET METHODES

### A. CONSTRUCTIONS

#### 1. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La PCR est une méthode permettant l'amplification d'un fragment d'ADN au moyen de deux oligonucléotides situés de part et d'autre de ce fragment de manière à ce que leur extrémité 3' pointe vers l'intérieur. Une ADN polymérase thermostable peut ainsi, à partir de ces oligonucléotides, réaliser une polymérisation d'ADN en prenant comme modèle le brin complémentaire, à la manière de la réplication semi-conservative.

Plusieurs PCR sont réalisées dans ce mémoire. Deux enzymes sont employées: Biotools (B&M Labs) et Expand High Fidelity (Roche). Différents oligonucléotides sont utilisés:

pCAL-s-BamHI	5' – <u>CGG – ATC – CGG</u> – GCC – TCG – GAG – CTT – AAG – CCC – 3'
	<i>BamHI</i>
pCAL-as-BamHI	5' – GCG – <u>GAT – CCA</u> – GCT – GCC – CGT – TTA – TGG – TTC – CA – 3'
	<i>BamHI</i>
pGSTk-s-BamHI	5' – <u>CGG – ATC – CGC</u> – CTC – GGA – GCT – TAA – GCC – C – 3'
	<i>BamHI</i>
pGSTk-as-SmaI	5' – <u>CCC – CGG – GCC</u> – AGC – TGC – CCG – TTT – ATG – GT – 3'
	<i>SmaI</i>
pGEX-s	5' – TAT – TGA – AGC – TAT – CCC – ACA – AAT – TGA – 3'
pGEX-as	5' – CGC – CCT – GAC – GGG – CTT – GTC – T – 3'
gt11a	5' – ATC – GAC – GGT – TTC – CAT – ATG – GG – 3'
gt11b	5' – TTT – GAC – ACC – AGA – CCA – ACT – GG – 3'

Les composants de la réaction sont les suivants: l'enzyme, le tampon adéquat (contenant du  $MgCl_2$ ), deux oligonucléotides possédant des extrémités 3' convergentes, des déoxynucléotides, l'ADN à amplifier et de l'eau stérile pour amener au volume final. Les proportions de ces éléments sont fonction de l'enzyme choisie.

L'amplification se déroule dans un appareil GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer), permettant la réalisation de différents cycles de températures. Classiquement, l'échantillon est porté à 94-95°C durant un certain laps de temps afin de dénaturer l'ADN double brin. Ensuite, plusieurs cycles de dénaturation (94-95°C), d'hybridation (à une température variant en fonction de la composition des amorces) et d'élongation (72°C) sont effectués, suivis par une élongation finale à 72°C.

Les résultats des différentes PCR sont analysés sur gel d'agarose 1%. Le marqueur Smart Ladder (Eurogentec) permet l'évaluation de la taille des différents fragments d'ADN.

## 2. PURIFICATION D'ADN

Les produits de PCR et de restriction sont purifiés par extraction d'un gel d'agarose au moyen du kit Minelute GelExtraction (Qiagen) et selon le protocole fourni avec le kit. L'ADN est élué au moyen d'eau stérile.

## 3. RESTRICTIONS

Le vecteur pGEX-2TK et l'insert amplifié et purifié sont restreints à l'aide des enzymes *SmaI* et *BamHI* (Roche), clivant l'ADN au niveau des sites suivants:

<i>SmaI</i>	5' – CCC   GGG – 3' 3' – GGG   CCC – 5'
<i>BamHI</i>	5' – G   GATCC – 3' 3' – CCTAG   G – 5'

Les composants de la réaction de restriction sont: l'ADN à digérer, la ou les enzymes de restriction, le tampon approprié et de l'eau stérile pour amener au volume final. Cette mixture est incubée à 37°C pendant deux heures.

## 4. LIGATION

L'enzyme T4 DNA ligase (New England Biolabs) est utilisée pour effectuer la ligation entre les deux fragments de restriction, le core d'hyal2 et le vecteur pGEX-2TK, possédant des extrémités compatibles.

Le mélange de réaction comporte les éléments suivants: le vecteur linéarisé et l'insert, restreints comme explicité plus haut, la T4 DNA ligase, son tampon et de l'eau stérile pour porter à volume. Cette mixture est incubée deux heures à température ambiante puis directement utilisée pour la transformation.

## 5. CULTURE DE BACTERIES

Les bactéries sont cultivées dans un milieu LB (Luria-Bertani). Le même LB additionné d'agar (Gibco) à une concentration de 15 g/l et coulé dans des boîtes de Pétri de 90 mm est utilisé pour la culture sur support solide. Les milieux sont éventuellement additionnés d'ampicilline à une concentration de 60 µg/ml.

Commenté [A5]: concentration?



## 6. PRODUCTION DE BACTERIES ELECTROCOMPETENTES

Les bactéries électrocompétentes (TOP10 et BL21(DE3)) ont été préparées selon le protocole proposé dans l'ouvrage "*Current Protocols in Molecular Biology*" (Seidman & Struhl, 1997).

## 7. ELECTROTRANSFORMATION

Dans une cuvette d'électroporation sont déposés 100 µl de bactéries électrocompétentes et 2 µl de plasmide ou de mélange de ligation. Le mélange est alors soumis à un choc électrique de 2400 V, puis dilué dans du LB et incubé 1 heure à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées en plusieurs dilutions sur milieu solide sélectif et incubées durant la nuit à 37°C.

## 8. CONSERVATION DES BACTERIES

A une culture saturée de bactéries est ajouté un même volume d'une solution de LB/glycérol dans des proportions 6/4 v/v. Les bactéries sont aliquotées dans des cryotubes et congelées à -80°C.

## 9. MAXI-PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE

Les maxi-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées au moyen du kit Plasmid Maxikit (Qiagen) et selon la marche à suivre décrite dans le fascicule accompagnant le kit. L'ADN est resuspendu dans de l'eau stérile.

## 10. DOSAGE D'ADN

La mesure de l'absorbance à 260 nm permet de doser l'ADN contenu dans une solution. Une unité d'absorbance est considérée comme correspondant à 50 µg d'ADN par ml. Le degré de pureté de la préparation d'ADN peut être estimé par le rapport entre l'absorbance mesurée à 260 nm et celle mesurée à 280 nm qui représente le pic d'absorbance des protéines.

## 11. SEQUENÇAGE

La vérification de la construction pGEX-2TK-hyal2 et l'identification des peptides encodés par les clones de phage positifs au criblage (voir ci-dessous) s'effectuent par séquençage automatique sur un appareil ABI PRISM (Perkin Elmer). Le séquençage

automatique requiert 500 ng de plasmide ou 100 ng de produit de PCR ainsi qu'une amorce par réaction.

Les oligonucléotides utilisés sont:

pGEXs	5' – TAT – TGA – AGC – TAT – CCC – ACA – AAT – TGA – 3'
pGEXas	5' – CGC – CCT – GAC – GGG – CTT – GTC – T – 3'
PB3	5' – TGC – ACA – CCT – GCC – CAT – GCT – G – 3'
PB4	5' – AGC – ACA – TTC – TTG – TGT – GGG – 3'
PB11	5' – GGC – CGC – TGT – CCT – GAC – GTG – G – 3'
PB13	5' – ATG – GCC – ATG – GGC – GCT – GTG – 3'
gt11a	5' – ATC – GAC – GGT – TTC – CAT – ATG – GG – 3'

## B. PRODUCTION DE LA PROTEINE HYAL2

### 1. INDUCTION

Le soir précédant l'induction, 20 ml de LB-Ampicilline sont inoculés à partir d'un stock de la bactérie transformée par le plasmide d'intérêt (pGEX-2TK-hyal2ΔGPIΔPS) et conservé à –80°C.

Le lendemain, la culture (1/50 à 1/20) est diluée dans 200 ml de LB-Ampicilline. Elle est placée sous agitation à 37°C durant un temps suffisant pour qu'elle atteigne une densité optique à 600 nm de 0,3-0,5.

A ce moment, 200 µl d'IPTG (Sigma) 100 mM sont ajoutés pour obtenir une concentration finale de 0,1 mM. La culture est laissée sous agitation (200-225 rpm) à 37°C pendant 2 heures et demie.

### 2. EXTRACTION DES PROTEINES

La culture est transférée dans un tube adéquat et centrifugée 30 minutes à 3000 rpm dans une centrifugeuse Beckmann J-21B munie d'un rotor JA-14.

Le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans 8 ml de PBS. Du lysozyme est ajouté à une concentration finale de 1mM. Le tout est incubé pendant 15 minutes à 4°C sur une roue.

Le mélange est soniqué jusqu'à obtention d'une lyse de 80%. Plusieurs cycles de 30 secondes de sonication suivies de 30 secondes sur glace sont nécessaires. Le pourcentage de lyse peut être déterminé par mesure de la DO<sub>600</sub> sur de petites aliquotes prélevées avant adjonction de lysozyme, avant et après sonication. La DO<sub>600</sub> doit diminuer 5 fois.

Du Triton-X100 est ajouté à une concentration finale de 1%. Le tout est aliquoté dans des tubes Eppendorf et centrifugé pendant 5 minutes dans une microfuge à vitesse maximale et à 4°C.

Le surnageant est prélevé et éventuellement additionné d'inhibiteurs de protéases (Roche).

### 3. PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

L'échantillon (le surnageant de l'étape précédente) est clarifié à l'aide d'un filtre muni de pores de 0,45 µm de diamètre.

Une colonne de glutathion-Sépharose GStrap FF d'un volume de 1 ml (Amersham) est placée sur son support et équilibrée par 5 ml de PBS pH 7,3.

L'échantillon est déposé et s'écoule à travers la colonne avec un débit d'environ 0,2 ml/min.

La colonne est lavée par 10 ml de PBS pH 7,3.

Le clivage du tag GST peut être obtenu par incubation de la colonne avec 80 µl d'une solution de thrombine 1U/µl (Amersham) dilués dans 920 µl de PBS, à température ambiante et pendant 2 à 16 heures.

La protéine d'intérêt, dépourvue de son tag GST est récoltée au moyen de 3 ml de PBS, en fractions de 500 µl.

La GST est éluée de la colonne par 10 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant 10 mM de glutathion réduit.

La thrombine, quant à elle, toujours présente dans les fractions renfermant notre protéine d'intérêt, peut être retirée au moyen d'une colonne benzamidine-Sépharose (Amersham).

Dans le cas où l'élimination du tag n'est pas souhaitée, l'élution de la protéine recombinante est réalisée à l'aide d'une solution de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant 10 mM de glutathion réduit. Si un clivage à la thrombine a été adopté, l'éluat contient la GST seule. Si celle-ci n'a pas été éliminée, l'éluat contient la protéine de fusion et est récolté en fractions de 500-1000 µl.

### 4. DOSAGE DES PROTEINES

La mesure de l'absorbance à 280 nm permet l'estimation de la concentration en protéines d'une solution, en utilisant la relation selon laquelle 1 unité d'absorbance est équivalente à 0,5 mg/ml.

## 5. ANALYSE DES RESULTATS

La qualité de l'induction et l'efficacité de la colonne d'affinité sont analysées par SDS-PAGE, au moyen de gels de polyacrylamide 12% et d'une coloration au bleu de Coomassie (Biorad). Des Western blot sont aussi réalisés à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre une séquence peptidique d'hyal2 de 16 acides aminés (PG RTPSEPQLRPEGEL), mis au point dans le Laboratoire de physiologie-pharmacologie, ainsi que d'anticorps polyclonaux de chèvre anti-GST (Amersham). Ces deux anticorps sont dilués d'un facteur 2000 dans du PBS-Tween 0,1 % contenant 10 mg/ml d'albumine bovine ou BSA (Sigma). Les anticorps secondaires (Dako), utilisés également à une dilution de 1/2000 dans du PBS-tween 0,1 % contenant 10 mg/ml de BSA sont couplés à la HRP (horse-radish peroxidase) dont l'activité est révélée au moyen d'un kit ECL (Perkin-Elmer). Les tailles sont évaluées au moyen d'un marqueur de tailles PrecisionPlus (Biorad).

---

## C. CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADNc EXPRIMEE EN PHAGE $\lambda$ GT11

---

La procédure décrite ici s'inspire de plusieurs ouvrages (Stone, 1999; Sambrook *et al*, 1989; Clontech, 1994).

### 1. SOLUTIONS

#### Tampon PKA 10x:

200 mM Tris-HCl pH 7,5

10 mM DTT

1 M NaCl

120 mM MgCl<sub>2</sub>

Filtrer et stocker jusqu'à 6 mois à température ambiante.

#### Z'-KCl:

25 mM HEPES-OH pH 7,4

12,5 mM MgCl<sub>2</sub>

20% glycérol

100 mM KCl

1 mg/ml BSA

1 mM DTT

Filtrer et conserver jusqu'à 6 mois à 4°C.

#### SM (Suspension medium) 10x

0,35 M Tris-HCl pH 7,5

1 M NaCl

0,1 M MgSO<sub>4</sub>

Autoclaver et conserver à 4°C.

#### SM 1x

100 ml de SM 10x

5 ml d'une solution de gélatine 2%

Porter à un volume de 1l, autoclaver et stocker à 4°C.

#### HBB (HEPES blocking buffer)

20 mM HEPES-OH pH 7,4

5 mM  $MgCl_2$

1 mM KCl

Stocker à température ambiante. Avant utilisation, ajouter 5% de poudre de lait écrémé.

#### BB (Binding buffer)

20 mM HEPES-OH pH 7,4

7,5 mM KCl

0,1 mM EDTA

2,5 mM  $MgCl_2$

Stocker à température ambiante. Avant utilisation, ajouter 1% de poudre de lait écrémé.

#### PBS 1x

123 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

1,4 mM  $KH_2PO_4$

Porter à un pH de 7,3.

## 2. PHOSPHORYLATION DE L'APPAT

La PKA (250U, Sigma P-2645) est resuspendue dans 25  $\mu$ l de DTT 40mM fraîchement préparé. La solution est laissée environ 10 minutes à température ambiante avant utilisation.

La mixture suivante est préparée:

1  $\mu$ l de la PKA resuspendue dans le DTT (voir étape n°1)

3  $\mu$ l de tampon 10x

5  $\mu$ l de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  10 mCi/ml (~6000 mCi/mmol) (Amersham)

1 à 10  $\mu$ l (~1 $\mu$ g) de protéine recombinante

de l'eau jusqu'à un volume final de 30  $\mu$ l.

Le tout est incubé une heure à température ambiante.

La réaction est arrêtée en ajoutant 170  $\mu$ l de  $Z'\text{-KCl}$  glacé et laissée sur la glace jusqu'à utilisation. Une aliquote est prélevée pour le comptage.

L'ATP non incorporé est éliminé au moyen de deux colonnes "microspins Sephadex G-50" (Roche). Celles-ci, préalablement préparées selon leur mode d'emploi, sont déposées dans des tubes Eppendorf. Sur chaque colonne, 100  $\mu$ l de l'échantillon sont déposés puis centrifugés à 4°C pendant 4 min à 4000 x g. Les effluents sont récoltés et rassemblés.

La colonne est rechargée avec 100  $\mu$ l de  $Z'\text{-KCl}$ . Le tout est recentrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. Les effluents sont récoltés et rassemblés.

Des aliquotes sont prélevées et déposées dans des tubes de comptage remplis de 4 ml de scintillant lumasafe. Les coups de Cerenkov sont mesurés et le nombre de cpm/ $\mu$ l est calculé. D'autre part, des aliquotes sont déposées sur un gel d'acrylamide 12%, en parallèle avec un marqueur de taille PrecisionPlus (Biorad) et un marqueur au  $^{14}\text{C}$  (Amersham). Le gel séché est exposé à un film d'autoradiographie Kodak MR dont on procède ensuite au développement.

### 3. PREPARATION DE LA BANQUE

#### 3.1. Préparation des bactéries

La banque utilisée est clonée dans le phage  $\lambda$ gt11. L'hôte de choix pour ce phage est la souche d'*E. coli* Y1090r. Celle-ci doit être rendue compétente avant utilisation selon la procédure suivante:

Une boîte de pétri contenant du LB additionné d'ampicilline estensemencée à partir d'un stock d'*E. coli* Y1090r conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La culture est incubée durant la nuit entière à  $37^{\circ}\text{C}$ . La boîte peut ensuite être conservée deux semaines à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Une colonie isolée estensemencée dans 50 ml de LB + 0,2% de maltose. La culture est incubée sous agitation et à  $37^{\circ}\text{C}$  pour la nuit.

Le lendemain, la culture est centrifugée 10 minutes à température ambiante et à 4000 x g.

Le culot de bactéries est resuspendu dans ~20 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM de manière à ajuster la  $\text{DO}_{600}$  à 2,0. Les cellules se gardent au maximum 3 semaines à  $4^{\circ}\text{C}$  mais il est préférable de les utiliser les plus fraîches possible.

#### 3.2. Titrage de la banque

La banque utilisée dans ce mémoire est une banque d'ADNc d'embryon de souris au quinzième jour, construite par "random priming" et "oligo(dT) priming", clonée dans le phage  $\lambda$ gt11 et achetée chez Clontech (Cat. ML5003b).

Etant donné qu'il est important d'utiliser une densité de phages relativement précise, il convient de déterminer préalablement le titre de la banque.

2  $\mu\text{l}$  de la banque sont prélevés et dilués dans 1 ml de SM. Une dilution de 1/500 est ainsi obtenue. 2  $\mu\text{l}$  de cette dilution sont une deuxième fois dilués dans 1 ml de SM de manière à obtenir une dilution par rapport au stock de 1/250000.

Quatre tubes Falcon 2059 sont préparés, contenant respectivement :

100  $\mu\text{l}$  de SM – 2  $\mu\text{l}$  de la seconde dilution – 100  $\mu\text{l}$  de bactéries Y1090r

100  $\mu\text{l}$  de SM – 5  $\mu\text{l}$  de la seconde dilution – 100  $\mu\text{l}$  de bactéries Y1090r

100  $\mu\text{l}$  de SM – 10  $\mu\text{l}$  de la seconde dilution – 100  $\mu\text{l}$  de bactéries Y1090r

100  $\mu\text{l}$  de SM – 100  $\mu\text{l}$  de bactéries Y1090r

Les différents tubes sont vortexés et incubés 20 à 30 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  afin de permettre l'adsorption des phages.

A chaque tube sont ajoutés 3 ml de LB -  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) - Top Agarose (7,2 g/l) préalablement fondu et maintenu à  $48^{\circ}\text{C}$ . Le tout est rapidement mélangé et immédiatement coulé sur une petite boîte de pétri de 90 mm tapissée de LB -  $\text{MgSO}_4$  (10 mM) - Agar (15 g/l)

équilibrée à température ambiante. Après avoir permis à l'agarose de se solidifier pendant 5 minutes à température ambiante, la boîte est incubée à 37°C pendant la nuit.

Le lendemain, les plages de lyse, visibles sous forme de spots translucides au milieu d'un tapis opaque de bactéries, sont comptées. Le titre est déterminé par le calcul suivant :

$$\text{Titre} = (\text{nombre de plages/nombre de } \mu\text{l}) \times \text{facteur de dilution} \times 10^3 \text{ (pfu/ml)}$$

### 3.3. Criblage de la banque

La banque est étalée à raison de ~30000 pfu/boîte (d'après le titre déterminé préalablement). Pour le premier tour de criblage, de grandes boîtes (Ø140mm) tapissées de LB - MgSO<sub>4</sub> - Agar sont nécessaires. La marche à suivre est la même que pour le titrage, si ce n'est que les volumes sont plus importants : il faut compter, par boîte, 600 µl de SM contenant la bonne quantité de phages, 600 µl de Y1090r et 8 ml de LB - MgSO<sub>4</sub> - Top Agarose. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 3 heures. A ce moment, les boîtes sont maintenues en chambre froide jusqu'à utilisation.

Pendant ce temps, les membranes de nitrocellulose doivent être préparées. Il s'agit de numérotter et marquer en trois endroits chacune des membranes à l'aide d'un crayon. Elles sont ensuite incubées pendant 15 minutes dans une solution d'IPTG 10 mM puis séchées sur du papier Whatman 3MM.

Les membranes sont déposés sur les boîtes de Pétri et ces dernières sont marquées à l'aide d'un feutre de la même manière que les membranes, de manière à pouvoir par la suite les superposer très exactement. Le tout est incubé à 37°C pendant 3 heures supplémentaires afin d'induire l'expression des protéines encodées par la banque d'ADNc clonés dans les phages.

Les boîtes sont refroidies à 4°C pendant au moins 15 minutes. Cette étape a pour but d'éviter d'arracher la couche d'agarose lors du retrait des membranes.

Pour plus de sécurité un second marquage peut être effectué en perçant en différents endroits la membrane et la couche de LB - MgSO<sub>4</sub> - Agar à l'aide d'une aiguille n°22. Les membranes doivent être prudemment retirées et rincées 5 minutes dans du PBS. Les boîtes sont entourées de parafilm et conservées à 4°C.

Les membranes sont bloquées dans du HBB pendant au moins une heure à 4°C.

Elles sont ensuite incubées, à 4°C et durant toute la nuit, dans 25 ml de BB contenant la protéine radioactive à raison de 2,5 à 5 x 10<sup>5</sup> cpm/ml.

Chaque membrane est rincée 3 fois pendant 10 minutes dans du BB, puis séchée sur du papier Whatman 3MM. Elles sont entourées de papier Saran et disposées dans une cassette d'autoradiographie munie d'un écran intensificateur.

Un film Kodak MS est déposé au contact des membranes. La cassette d'autoradiographie est placée à -80°C jusqu'à impression suffisante du film.

Le film est développé. Il s'agit alors de faire coïncider les membranes avec les boîtes afin de prélever les zones positives au moyen d'un embout de pipette coupé. Les morceaux d'agarose ainsi obtenus sont déposés dans des tubes Eppendorf contenant 1 ml de SM. Les tubes sont vortexés. L'ajout d'une goutte de chloroforme permet une bonne conservation des phages. Ces derniers sont élués de l'agarose en une nuit à 4°C.

En considérant qu'une plage de lyse équivaut à  $10^6$ - $10^7$  pfu, deux dilutions sont préparées pour chaque spot positif. La procédure est identique au premier criblage mais il faut utiliser des boîtes de 90mm et adapter les différents volumes : 100 µl de SM contenant le phage, 100 µl de bactéries et 3 ml de LB -  $MgSO_4$  - Top Agarose.

Le criblage est effectué sur la boîte représentant la meilleure dilution (à peu près 100 plages de lyse/boîte). Les clones positifs sont repris dans du SM additionné d'une goutte de chloroforme. Un troisième tour est réalisé. Cette fois, une moitié de membrane est incubée avec la protéine GST-hyal2 et l'autre avec la GST seule. Cette étape permet d'éliminer les faux positifs dus à la GST.

Les clones positifs sont repris dans du SM après le troisième tour, et une goutte de chloroforme est ajoutée. L'ADN est amplifiée par PCR au moyen des amorces gt11a et gt11b s'hybridant de part et d'autre de l'insert. Ce dernier est séquencé à l'aide de l'amorce gt11a (la banque ayant été construite en partie avec des amorces polyA, le séquençage de la partie terminale au moyen de l'amorce gt11b est aléatoire).

#### 4. EXTRACTION D'ADN DE PHAGES

Le succès de l'amplification de l'ADNc cloné dans le phage peut être conditionné par la présence, dans la suspension de phage, d'inhibiteurs de la PCR. Ce problème peut être contourné par l'extraction et la purification du matériel génétique du phage, au moyen d'un kit AX (Nucleobond).

Les phages sont étalés sur des boîtes de Pétri recouvertes de LB –  $MgSO_4$  – Agar de la même manière que pour le criblage et à raison de  $10^5$  pfu par boîte de 90 mm. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 6-8 heures, jusqu'à ce que les plages de lyse se rejoignent. A ce moment, 5 ml de SM sont déposés sur chaque boîte et le tout est laissé, sous agitation, la nuit à 4°C.

Le lendemain, le SM est prélevé et l'ADN extrait au moyen du kit, selon les indications fournies avec celui-ci. L'ADN est resuspendu dans de l'eau stérile.





## RESULTATS

### A. PREPARATION DE L'APPAT

#### 1. CHOIX DE L'APPAT

Afin d'éviter tout problème potentiel lié à la présence d'une ancre GPI et d'un peptide signal dans la séquence d'hyal2 (**figure 4.1**), notamment des interférences avec le trafic cellulaire bactérien, nous avons choisi de travailler uniquement avec la partie centrale de la protéine, qui sera référée en tant que "core". Celui-ci a été obtenu à partir de la forme complète d'hyal2 clonée au sein du plasmide pCDNAI/Amp-hyal2 (**figure 4.2**). Il représente une poids moléculaire de 49 kDa (Van Moer, 2002). Pour produire la protéine-appât qui servirait au criblage de la banque d'expression, le choix du vecteur était important.

<b>MRAGLGPIIT LALVLEVA</b>	SELKPTAPPI	FTGRPFVVAW	NVPTQECAPR	50
<b>peptide signal</b>				
HKVPLDLRAF	DVEATPNEG	FNQNITTFYY	DRLGLYPRFD	100
PQNGSLCAHL	PMLKEAVERY	IQTQEPAGLA	VIDWEEWRPV	150
YRQSSRQLVA	SRHPDWPSDR	IVKQAQYEF	FAARQFMLNT	200
HLWGFYLFDP	CYNHDYVQNW	DSYTGRCPDV	EVARNQDLAW	250
SVYLDETLAS	SKHSRNFVSF	RVQEALRVAH	THHANHALPV	300
GLTELSQMDL	ISTIGESAAL	GSAGVIFWGD	SVYASSMENC	350
LVPYIVNVSW	ATQYCSWTQC	HGHGRCVRRN	PSASTFLHLS	400
TPSEPQLRPE	GELSEDDL	LQMHFRCHCY	LGWGGEQCQW	450
			NHKRAAGD <b>AS</b>	
<b>RAWAGAHLAS LLGLVAMTLT WTL</b>				473
<b>signal de l'ancre GPI</b>				

**Figure 4.1**

Séquence peptidique complète d'hyal2 de rat.

L'épitope reconnu par l'anticorps anti-hyal2 est souligné. Les parties N- et C-terminales non utilisées pour générer l'appât sont encadrées.

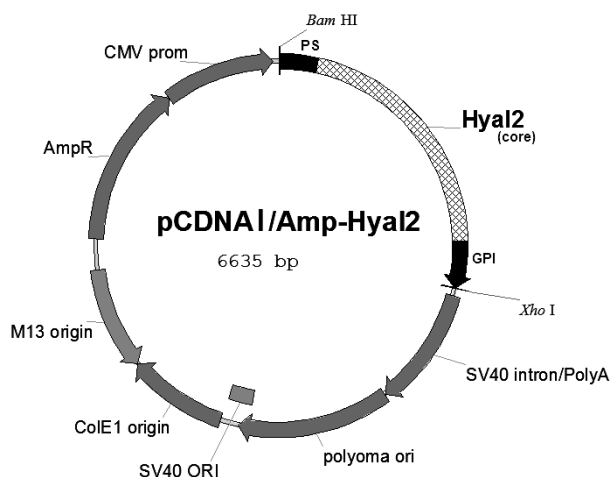


Figure 4.2  
Plasmide pCDNA1/Amp-hyal2.

## 2. CHOIX DU VECTEUR

Dans le cadre de ce travail, la détection isotopique des interactions qui seraient révélées par le criblage nous a paru plus intéressante et moins laborieuse que l'utilisation d'anticorps. Nous avons dès lors choisi d'utiliser, pour le marquage de l'appât, le  $[^{32}\text{P}]$  sous forme de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Le  $[^{32}\text{P}]$  a historiquement été d'abord utilisé pour isoler des protéines interagissant avec des récepteurs tyrosine kinase, la phosphorylation s'effectuant à l'intérieur de la protéine cible (Skolnik *et al.*, 1991; Margolis *et al.*, 1992). Par la suite, l'introduction d'un site de reconnaissance pour la PKA dans certains vecteurs d'expression a permis l'application de la technique à d'autres protéines qui ne sont pas phosphorylées *in vivo* (Ron & Dressler, 1992; Kaelin *et al.*, 1992). Nous avons donc choisi, pour le clonage d'hyal2, l'un de ces vecteurs encodant un site de phosphorylation.

## 3. LE VECTEUR PCAL-KC

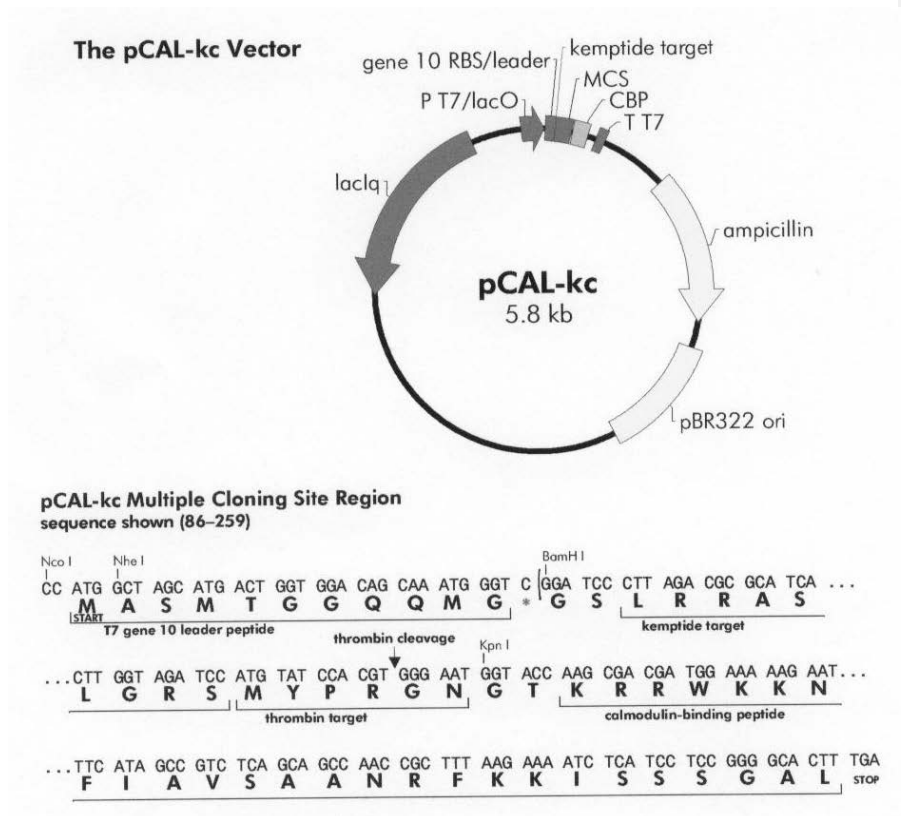
### 3.1. Présentation du vecteur et principe du système CBP

pCAL-kc (figure 4.3) a été le premier vecteur utilisé dans le cadre de ce mémoire en vue de la production d'une protéine recombinante comportant un tag d'affinité. pCAL-kc contient

la séquence du calmodulin-binding peptide (CBP), un peptide long de 26 acides aminés dérivant de la MLCK (myosin light chain kinase). En présence de  $\text{Ca}^{++}$ , le CBP peut se lier à la calmoduline avec une très grande affinité. Cette particularité a été mise à profit pour permettre la purification de protéines par affinité en une seule étape (Stofko-Hahn *et al.*, 1992), le principal avantage de ce système étant la forte stringence permise lors des lavages limitant le risque de contaminations par d'autres protéines. L'élution est réalisée au moyen d'agents chélateurs du  $\text{Ca}^{++}$  comme l'EGTA. En l'absence de  $\text{Ca}^{++}$ , l'association calmoduline-CBP est rompue et la protéine de fusion est relâchée et peut être récoltée.

Des vecteurs permettant la production de protéines recombinantes fusionnées au CBP ont été mis au point (Zheng *et al.*, 1997) et sont maintenant disponibles commercialement. Il s'agit des vecteurs de la série pCAL (Stratagene). Ils permettent l'expression de la protéine recombinante via le promoteur fort T7/*lacO*, hybride entre le promoteur T7 reconnu par la ARN-polymérase du phage T7 et l'opérateur *lac*. L'ARN-polymérase du phage T7, placée sous le contrôle du promoteur *lac*, est inductible par l'IPTG. L'opérateur *lac*, représentant le site de reconnaissance pour le répresseur *lacI<sup>q</sup>*, encodé lui aussi sur le vecteur, permet un contrôle strict de l'expression. Les vecteurs de la série pCAL proposent également un site de clivage reconnu par la thrombine permettant l'élimination éventuelle du tag CBP. pCAL-kc contient en outre un site de phosphorylation par la PKA. La purification par affinité peut être réalisée au moyen de calmoduline immobilisée sur une résine.

La faible taille du tag peut constituer l'un des gros avantages de ce système. Les 26 acides aminés dont il est constitué ne représentent en effet que 4 kDa (Zheng *et al.*, 1997). Il est intéressant pour la production de protéines en cellules procaryotes car ces dernières ne possèdent aucune protéine capable d'interagir avec la calmoduline. Chez les eucaryotes, par contre, ce système est tout à fait déconseillé en raison du grand nombre de protéines endogènes capables de se lier à la calmoduline de manière calcium-dépendante et de co-purifier avec la protéine d'intérêt.



**Figure 4.3**  
Structure du vecteur pCAL-kc (selon la firme Stratagene).

### 3.2. Construction de pCAL-kc-hyal2

Le core d'hyal2, amplifié à partir du plasmide pCDNAI/Amp-hyal2 au moyen des amorces pCAL-s-BamHI et pCAL-as-BamHI, a été introduit, via *Bam*HI, dans le vecteur pCAL-kc. Malgré le succès de la construction, vérifiée par séquençage automatique, le plasmide ainsi obtenu, référencé en tant que pCAL-kc-hyal2, n'a pas permis une induction décelable de l'expression d'hyal2-CBP, que ce soit par analyse en bleu de Coomassie ou par Western blot.

### 3.3. Inductions

Nous avons travaillé sur le plasmide pCAL-kc-hyal2 introduit dans une souche d'*Escherichia coli* BL21(DE3). Toute une série de conditions d'induction ont été testées:

différentes durées d'induction, différentes concentration en IPTG et différentes températures, le tout sans succès.

Un plasmide contrôle exprimant la  $\beta$ -galactosidase en fusion avec le CBP, référencé sous le nom de pTC12 et fourni avec le plasmide pCAL-kc a également été introduit dans les BL21(DE3). L'induction de l'expression de cette protéine recombinante selon les conditions recommandées par Stratagene n'a, elle non plus, pas donné de résultats. La firme n'a malheureusement pas pu nous fournir d'explication plausible.

### 3.4. Conclusion

Après de nombreuses tentatives d'induction infructueuses et n'ayant pu obtenir d'explication satisfaisante à ces échecs, nous avons décidé de nous rallier à un autre système, plus documenté: pGEX-2TK. Nous avons choisi de nous attarder plus longuement aux résultats obtenus avec ce vecteur.

## 4. PGEX-2TK

### 4.1. Description du système GST et du vecteur pGEX-2TK

L'un des systèmes de purification par tag d'affinité les plus utilisés à l'heure actuelle est sans doute le système basé sur l'interaction entre la GST du parasite helminthe *Schistosoma japonicum*, une protéine de 26 kDa, et le glutathion (Smith & Johnson, 1988).

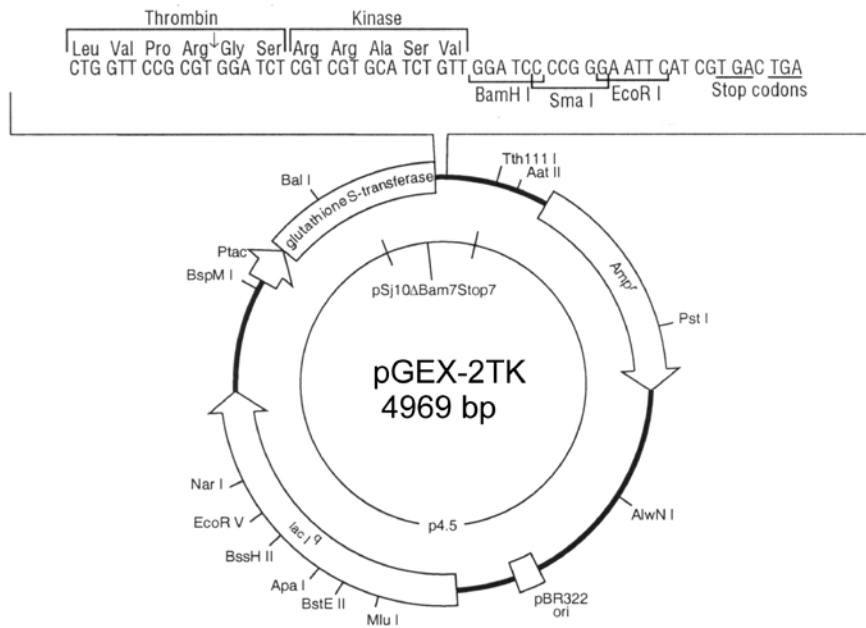
Les vecteurs de la série pGEX (Amersham) sont des vecteurs d'expression permettant la production de protéines en fusion avec la GST. La protéine cible est clonée en phase avec la GST, située en position N-terminale, sous le contrôle d'un promoteur fort *tac*, hybride formé de la région -10 du promoteur *lacUV5* et de la région -35 du promoteur *trp* (Amann *et al.*, 1983). L'induction de l'expression est obtenue par addition d'IPTG au milieu de culture. La répression en l'absence d'IPTG, quant à elle, est obtenue au moyen de *lacI<sup>q</sup>*. Ces vecteurs sont également porteurs du gène de la  $\beta$ -lactamase, *AmpR*, concédant aux bactéries qui en sont porteuses la résistance à l'ampicilline, et d'une origine de répllication *pBR322*.

La purification peut être effectuée sur une colonne d'affinité constituée d'une résine sur laquelle est immobilisé du glutathion, qui accroche la GST lors du passage de l'échantillon. La protéine recombinante reste fixée sur la colonne pendant que toutes les autres protéines sont lavées. L'élution de la protéine cible est obtenue au moyen de glutathion réduit qui rompt, par compétition, l'association entre la GST et le glutathion immobilisé sur la colonne.

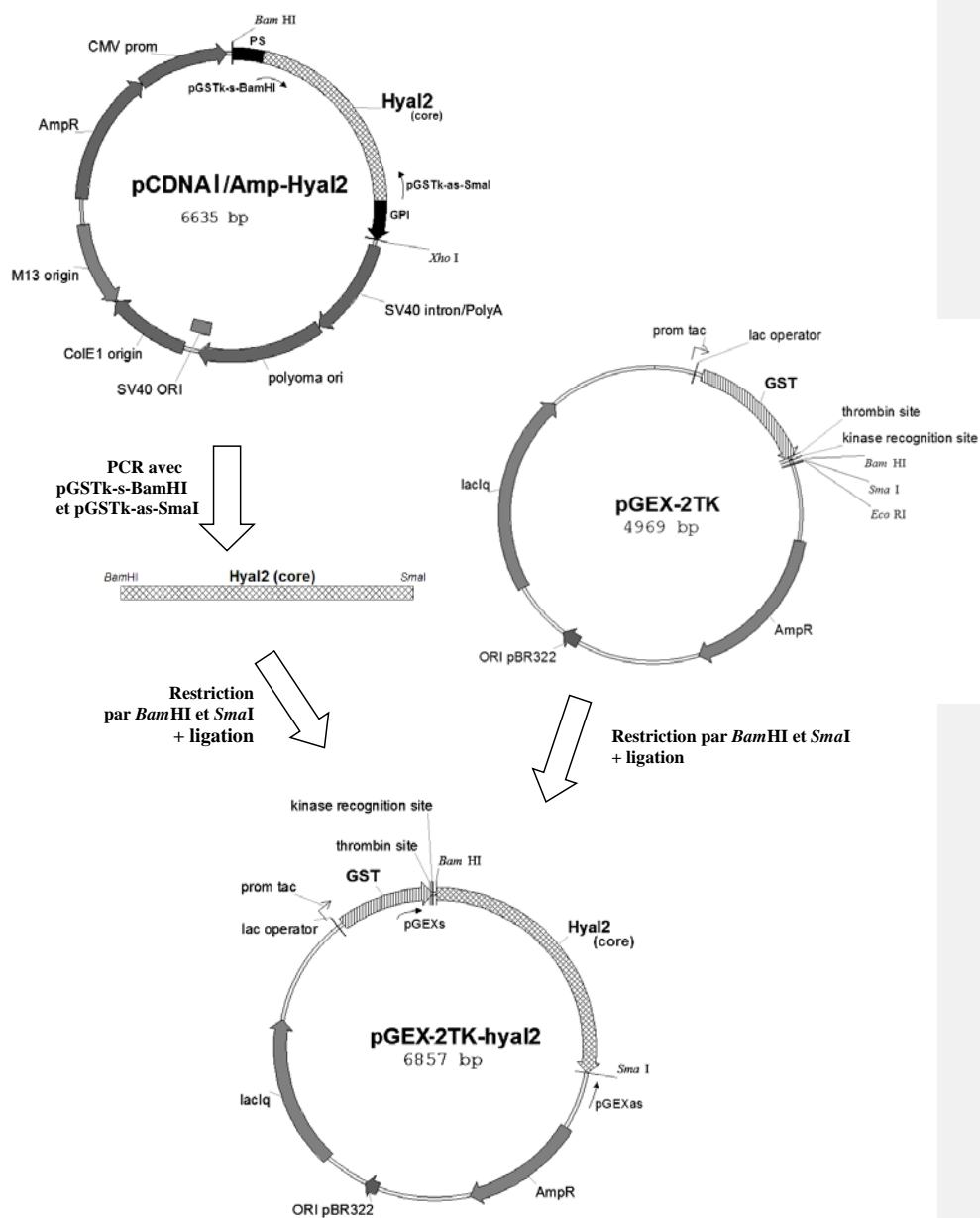
La purification peut également être réalisée sans colonne, au moyen de la même résine.

pGEX-2TK (**figure 4.4**) présente deux particularités par rapport aux vecteurs de la série pGEX: il contient un site de phosphorylation pour la PKA ainsi qu'un site de clivage pour la thrombine, permettant l'élimination éventuelle du tag GST après purification par chromatographie d'affinité. L'action de la thrombine détache la protéine d'intérêt fixée, par

l'intermédiaire de son tag GST, à la résine glutathion-Sépharose et en permet la récolte. La résine est régénérée à l'aide de glutathion réduit qui permet le décrochage de la GST. Le site multiple de clonage propose les sites de restriction *Bam*HI, *Sma*I et *Eco*RI.



**Figure 4.4**  
Structure du vecteur pGEX-2TK (selon la firme Amersham).



**Figure 4.5**

Schéma de la construction du plasmide pGEX-2TK-hyal2 à partir de pCDNA1/Amp-hyal2 et de pGEX-2TK et position des oligonucléotides pGEXs et pGEXas utilisés pour la vérification de la construction.



#### 4.2. Construction de pGEX-2TK-hyal2

Le plasmide pGEX-2TK-hyal2 a été construit à partir du vecteur pGEX-2TK et du plasmide pCDNAI/Amp-hyal2, contenant l'ADNc d'hyal2 cloné au niveau des sites de restriction *XhoI* et *BamHI*. La **figure 4.5** résume la construction réalisée.

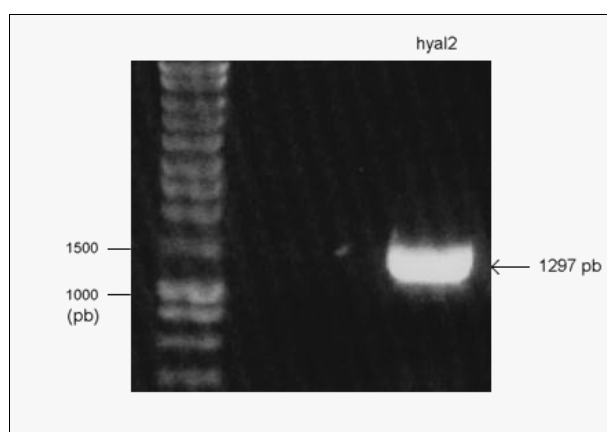
##### Préparation du vecteur

La première étape du travail consiste en l'amplification du vecteur. Celui-ci a été introduit par électrotransformation dans une souche d'*Escherichia coli* TOP10. Une maxi-préparation de l'ADN du vecteur a été effectuée à partir d'une culture réalisée sous ampicilline au départ d'un clone transformant, sélectionné également sur un milieu contenant de l'ampicilline.

##### Création de l'insert

Avant insertion dans le vecteur pGEX-2TK, hyal2 a d'abord été amplifiée par PCR au moyen des amorces baptisées pGSTk-s-BamHI et pGSTk-as-SmaI, la première s'appariant juste après la séquence du peptide signal et la seconde juste avant la séquence de la partie C-terminale hydrophobe clivée au profit de l'ancre GPI. Les sites *SmaI* et *BamHI* ont respectivement été introduits à l'extrémité de ces oligonucléotides.

La PCR a été effectuée au moyen de l'enzyme Expand High Fidelity (Roche), possédant une activité "proof reading", afin de limiter le risque d'erreur dans les produits de PCR. Le produit obtenu a été analysé sur gel d'agarose 1%, révélant une bande compatible avec la taille attendue de 1297 paires de bases (**figure 4.6**). Cette bande a été extraite de l'agarose et purifiée. L'ADN obtenu a été resuspendu dans de l'eau stérile.



**Figure 4.6**

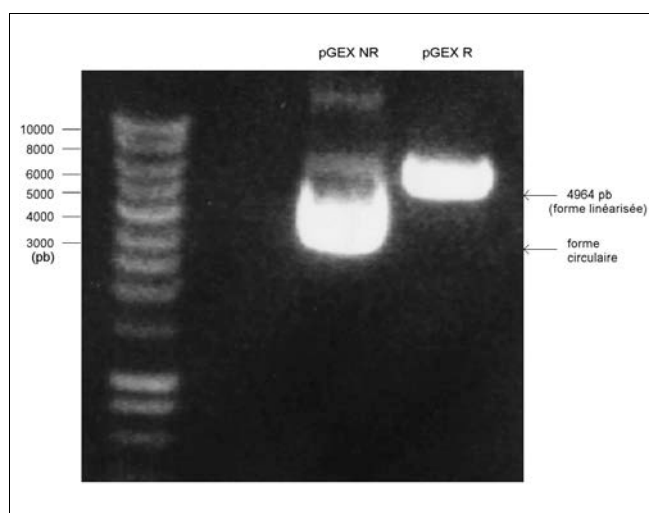
Amplification du core d'hyal2 clonée dans le plasmide pCDNAI/Amp-hyal2 au moyen des amorces pGSTk-s-SmaI et pGSTk-as-BamHI.

## Restrictions

Le site multiple de clonage du vecteur pGEX-2TK contient, comme mentionné précédemment, les sites de restriction *Bam*HI, *Sma*I et *Eco*RI. Les deux premiers ont été choisis pour l'introduction d'*hyal2* dans le vecteur (il existe un site *Eco*RI à l'intérieur de la séquence d'*hyal2* empêchant le clonage par l'intermédiaire de ce site). L'utilisation de deux enzymes de restriction permet le clonage directionnel de l'insert en générant des extrémités ne pouvant s'assembler que d'une seule façon, contrairement à la restriction avec une enzyme unique qui peut déboucher sur l'introduction de l'insert dans le mauvais sens ou en plusieurs exemplaires ou sur le repliement du vecteur sur lui-même et nécessite dès lors le criblage d'un plus grand nombre de clones pour l'obtention d'un transformant correct.

Le vecteur et le produit de PCR obtenus ci-dessus ont donc été restreints au moyen des enzymes *Bam*HI et *Sma*I. Pour la restriction de pGEX-2TK, les deux sites se chevauchant quelque peu, nous avons opté pour une restriction en deux temps. En effet, l'action de *Bam*HI entraînant la disparition du site *Sma*I mais pas l'inverse, nous avons préféré laisser agir cette dernière enzyme avant d'ajouter *Bam*HI.

La restriction de pGEX-2TK a été vérifiée sur gel d'agarose 1% par comparaison avec le vecteur sous forme circulaire (**figure 4.7**). Après action des enzymes, la linéarisation du vecteur a provoqué un déplacement de sa zone de migration. Il est cependant impossible d'affirmer le bon fonctionnement des deux restrictions puisqu'un seul clivage produirait le même déplacement. La restriction de l'insert, quant à elle, ne peut être visualisée sur gel car, n'éliminant que 8 paires de bases, elle n'entraîne pas de modification décelable de la migration électrophorétique.



**Figure 4.7**

Restriction du vecteur pGEX-2TK par *Sma*I et *Bam*HI. pGEX NR = vecteur non restreint; on peut voir le vecteur sous ses trois formes : linéarisé, circulaire et superenroulé; la forme circulaire prédomine. pGEX R = vecteur restreint; le vecteur est ici sous sa forme linéarisée.

### Ligation

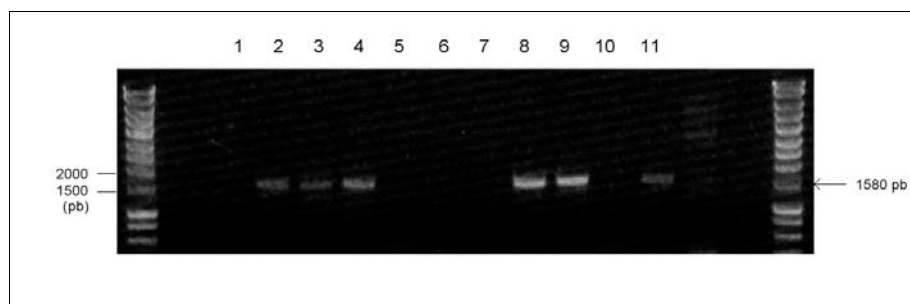
Après restriction par les enzymes *Sma*I et *Bam*HI, l'insert et le vecteur possèdent théoriquement des extrémités compatibles. Leur ligation a été effectuée à l'aide de T4 DNA ligase, enzyme catalysant la formation d'un lien phosphodiester entre un phosphate 5' et un groupement hydroxyle 3' situé à proximité immédiate.

### Transformation

Le produit de la réaction de ligation a directement été électroporé dans une souche d'*Escherichia Coli* BL21(DE3) rendue électrocompétente. Etant donné sa déficience en protéases *lon* et *ompT*, elle constitue une souche de choix pour la production de protéines recombinantes.

### Analyse des transformants

Les colonies obtenues, au nombre de 11, ont été analysées par PCR au moyen des amorces pGEXs et pGEXas (**figure 4.5**) afin de s'assurer que le plasmide complet, contenant *hyal2*, y était bien présent. Six colonies se sont révélées positives, une bande correspondant à la taille attendue de 1580 paires de bases étant visible sur gel d'agarose (**figure 4.8**). Ces clones ont été congelés dans un milieu contenant du glycérol à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour conservation.

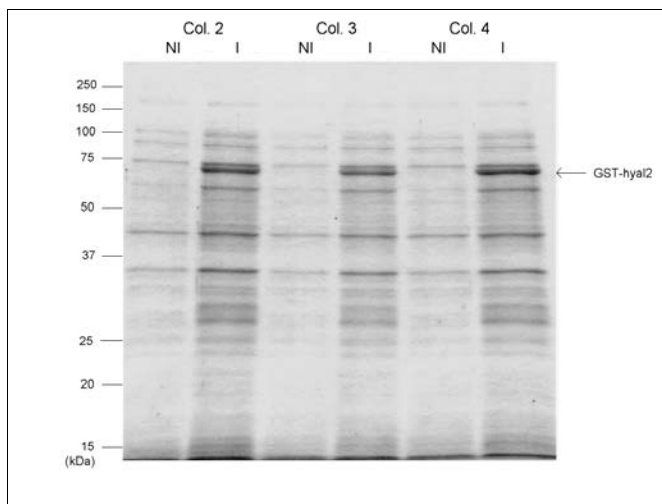


**Figure 4.8**

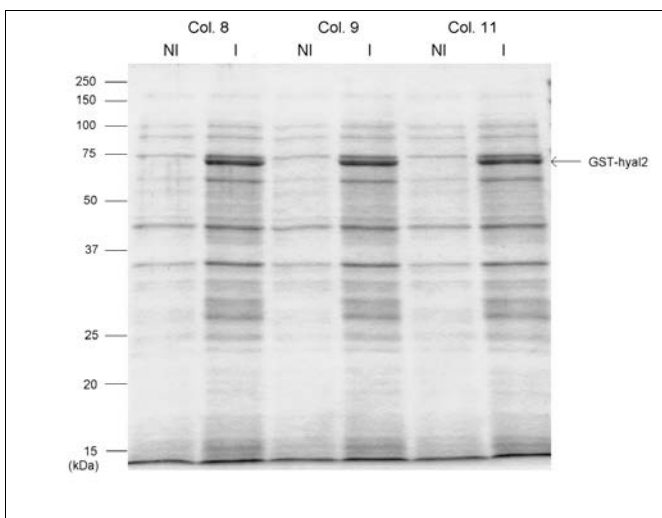
Criblage par PCR des colonies BL21 sélectionnées sur milieu LB-Ampicilline, au moyen des oligonucléotides pGEXs et pGEXas. Les lignes 1 à 11 réfèrent aux différentes colonies criblées. Les colonies 2,3,4,8,9 et 11 sont positives.

Une analyse de l'ampleur de l'induction des différents clones a été réalisée. Il s'agissait de spécifier si certains semblaient plus productifs, donc plus intéressants, que d'autres. Pour ce faire, les six clones positifs pour la PCR ont été induits dans les conditions suivantes:  $\text{DO}_{600}$  de départ égale à 0,3, concentration en IPTG de 1 mM, période d'induction de 2 heures et température de  $37^{\circ}\text{C}$ . L'induction a ensuite été analysée en SDS-PAGE suivi par une coloration au bleu de Coomassie. La protéine recombinante, visualisée sous forme d'une

bande n'apparaissant dans les échantillons qu'après induction, s'est révélée produite dans des quantités similaires dans les différents clones (**figures 4.9 a et b**).



a.

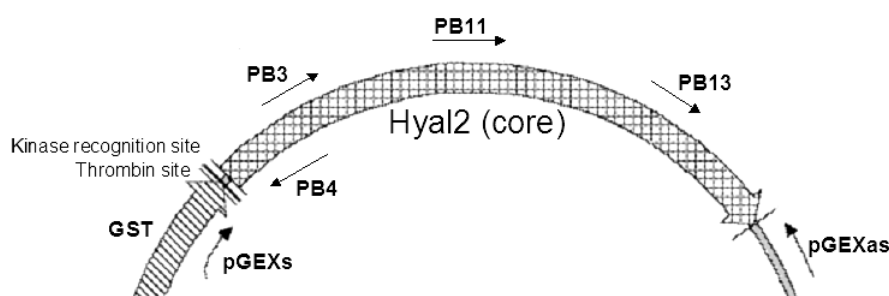


b.

**Figures 4.9 a et b**

Analyse en SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de l'induction par l'IPTG de l'expression de GST-hyal2 dans les colonies 2,3,4,8,9 et 11. NI = non induit. I = induit.

L'ADN des clones 8 et 9, choisis de manière arbitraire, a été préparé au moyen du kit Qiagen pour être analysé par séquençage automatique. De cette manière, il a été possible de s'assurer qu'aucune erreur n'avait été introduite lors de la PCR et que l'insert était bien en phase avec les différents éléments du vecteur (site d'initiation de la transcription, tag GST,...). Le séquençage a été réalisé à partir des oligonucléotides pGEXs et pGEXas, s'hybridant de part et d'autre de l'insert, et des oligonucléotides PB3, PB4, PB11 et PB13, s'hybridant à la séquence du core d'hyal2 (**figure 4.10**).



**Figure 4.10**

Schéma de la position des différentes amorces utilisées pour le criblage des colonies et le séquençage de la construction pGEX-2TK-hyal2.

Le clone 9, ne comportant aucune erreur lors du séquençage, a été choisi pour la suite des manipulations.

#### 4.3. Production et purification de la protéine recombinante GST-hyal2

##### Mise au point des conditions d'induction

Toutes les protéines recombinantes ne se comportent pas de la même façon, si bien qu'il est nécessaire de déterminer empiriquement les conditions dans lesquelles elles sont le plus efficacement produites. Durée de l'induction, température et concentration en IPTG sont des paramètres qui peuvent influencer l'expression de la protéine.

Nous avons testé différentes conditions d'induction sur des échantillons de 10 ml d'une culture bactérienne située dans la phase exponentielle de sa courbe de croissance. C'est en effet à ce moment que les bactéries sont le plus productives. L'IPTG a été ajouté à la culture quand sa  $DO_{600}$  se situait entre 0,3 et 0,5.

Le facteur temps a d'abord été étudié : des essais de 1 à 4 heures d'induction ont mis en évidence une production maximale à partir de trois heures d'induction. Le facteur température a été testé par des inductions à 20, 25, 30 et 37°C mais ne s'est pas montré significatif. A ce stade, les conséquences de la variation de la concentration en IPTG n'ont pas été étudiées.

#### Induction dans les conditions optimales

Après les différents tests réalisés, les conditions suivantes ont été adoptées : une durée de trois heures, 1mM d'IPTG, à 37°C. Les inductions ultérieures ont été réalisées selon ces conditions et dans des cultures de plus grand volume (200 ml). Il s'agissait maintenant de mettre au point les étapes d'extraction et de purification de la protéine produite.

#### Extraction des protéines

La plupart du temps, une protéine recombinante est, chez les procaryotes, produite à l'intérieur du cytoplasme. Elle doit dès lors, préalablement à la purification, être extraite par lyse bactérienne. Différentes techniques permettent de lyser les bactéries: broyage mécanique, choc osmotique, cycles de congélation-décongélation, etc.

Nous avons opté pour la sonication. Il s'agit d'une méthode relativement facile et rapide. Les bactéries, après incubation sous IPTG, ont été centrifugées et resuspendues dans 8 ml de PBS. Elles ont été lysées par sonication, puis un détergent non ionique, le Triton-X100, a été ajouté à la suspension. Une étape de centrifugation a permis l'obtention d'un culot et d'un surnageant de lyse. L'analyse en SDS-PAGE de ces deux fractions a révélé une prépondérance de la protéine dans le culot (**figure 4.11**). Ces résultats semblent indiquer une production de la protéine en majorité sous forme insoluble dans les corps d'inclusion.

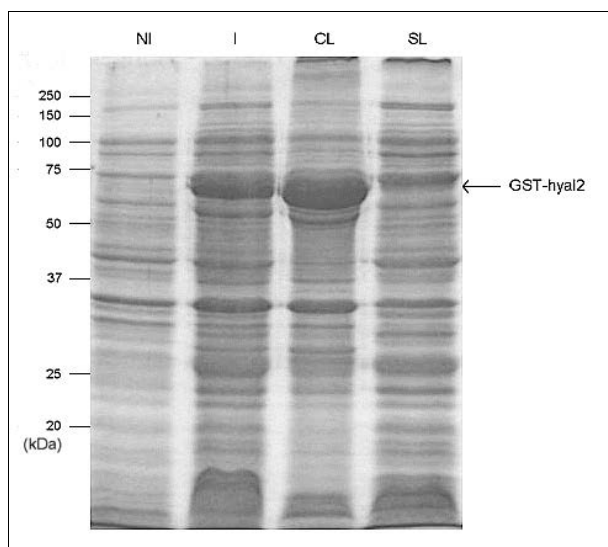
Il arrive fréquemment que dans le cytoplasme bactérien la surproduction d'une protéine résulte en une accumulation de celle-ci dans des corps d'inclusion. Les paramètres intervenant dans ce phénomène sont encore mal connus. Une étude statistique (Wilkinson & Harrison, 1991) est parvenue à la conclusion que différents facteurs influencent la solubilité intracytoplasmique des protéines : la charge moyenne, le pourcentage de résidus rigides, la proportion de cystéine et de proline, l'hydrophilicité et le nombre total de résidus.

Ainsi, dans un certain nombre de cas pratiques, des protéines recombinantes produites chez *E. coli*, notamment en fusion avec la GST, se sont révélées insolubles et difficiles à extraire et à purifier sous forme active. Les techniques utilisées pour tenter de limiter la formation de corps d'inclusion foisonnent. Elles passent par la diminution de la température de culture, la diminution de la concentration en agent inducteur, l'utilisation de différentes souches d'*E. coli*, la mutagenèse dirigée, l'ajout de certains solvants comme le sorbitol ou la glycine bêtaïne à la culture bactérienne, l'utilisation de différents détergents, etc (Blackwell & Horgan, 1991; Frangioni & Neel, 1993; Makrides, 1996). Malgré tout, se débarrasser des corps d'inclusion est une tâche ardue qui n'apporte pas toujours les résultats escomptés.

Nous avons tenté d'augmenter la proportion de protéine GST-hyal2 soluble en modifiant les conditions mises au point pour l'induction de son expression. Ces modifications passent par un ralentissement de la production afin de permettre à la protéine de se replier et d'adopter

sa conformation finale soluble. Nous avons opté pour une diminution de la concentration en IPTG à 0,1 mM et une réduction de la durée d'induction à 2 heures.

Pendant que, dans le laboratoire, d'autres techniques étaient testées afin d'obtenir une meilleure solubilisation, nous avons choisi de continuer à travailler avec le surnageant de lyse, renfermant une quantité de protéine plus faible que le culot mais jugée néanmoins suffisante dans l'objectif d'un criblage.



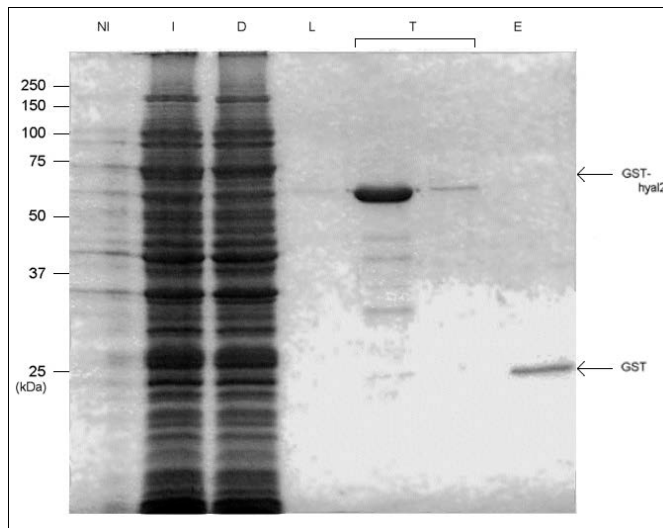
**Figure 4.11**

Analyse en SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de l'efficacité de l'extraction de GST-hyal2 par lyse bactérienne. NI = non induit. I = induit. CL = culot de lyse. SL = surnageant de lyse.

#### Purification sur la colonne GSTrap FF

Le surnageant de lyse, d'un volume d'environ 8 ml, a été déposé sur une colonne GSTrap FF. Celle-ci a ensuite été lavée à l'aide de PBS et incubée avec 80 unités de thrombine pendant une nuit entière à température ambiante. Nous nous sommes bien entendu assurés, préalablement à l'utilisation de thrombine, qu'il n'existait au sein du core d'hyal2 aucun site consensus reconnaissable par la protéase. Le lendemain matin, hyal2, en principe détachée de la GST, a été récoltée en fractions de 500 µl au moyen de PBS. La GST restée fixée sur la résine a été éluée au moyen de glutathion réduit, puis la colonne rééquilibrée dans l'éthanol.

La concentration en protéines des fractions sortant de la colonne a été déterminée par mesure de l'A<sub>280</sub>. Les fractions correspondant aux pics et aux vallées d'absorbance ont été analysées en SDS-PAGE avec une coloration au bleu de Coomassie (**figure 4.12**).



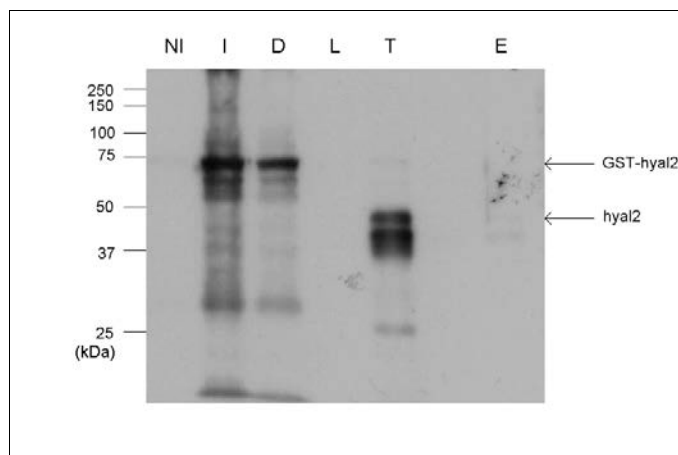
**Figure 4.12**

Analyse en SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie de la purification d'affinité sur colonne GSTrap de la protéine GST-hyal2 avec clivage à la thrombine. NI = non induit. I = induit. D = dépôt de l'échantillon (effluent). L = lavages. T = clivage à la thrombine. E = élution au glutathion réduit.

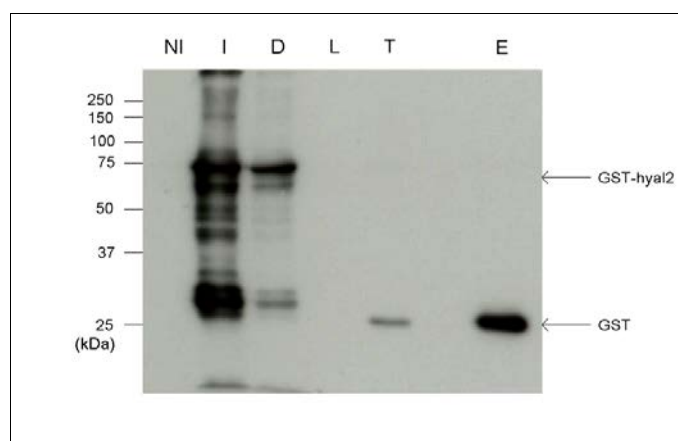
Après clivage à la thrombine (colonne T), on peut observer une bande prédominante de taille inférieure à la bande apparaissant lors de l'induction et supposée être la protéine de fusion GST-hyal2. Comme cette bande prédominante après clivage était située dans une gamme de tailles ne semblant correspondre ni à la protéine de fusion (~75 kDa), ni à hyal2 seule (~50 kDa), une analyse en Western blot au moyen des anticorps polyclonaux anti-hyal2 et anti-GST a été effectuée (**figures 4.13 a et b**). Ni l'anticorps anti-hyal2, ni l'anticorps anti-GST n'ont pu révéler cette bande. Nous en avons conclu qu'il ne s'agissait apparemment pas d'une forme raccourcie d'hyal2 qui serait encore liée à la GST, ni d'hyal2 tout court. Par contre, un doublet est reconnu par l'anticorps anti-hyal2 (mais pas par l'anticorps anti-GST) entre 37 et 50 kDa (**figure 4.13 a**, colonne T). La bande d'environ 50 kDa pourrait correspondre, vu sa taille, à hyal2 libérée de la GST. En ce qui concerne la bande inférieure, plus diffuse, aucune conclusion définitive ne peut être tirée. Il pourrait s'agir d'une forme dégradée d'hyal2.

La bande considérée comme correspondant à la protéine de fusion GST-hyal2 est bien reconnue par les deux anticorps dans l'échantillon induit déposé sur la colonne (**figure 4.13 a et b**, colonne I), ce qui confirme son identité. Dans l'élut au glutathion réduit (**figure 4.13 b**, colonne E), l'anticorps anti-GST ne révèle qu'une bande dans les environs de 25 kDa, qui est donc vraisemblablement la GST.





a.



b.

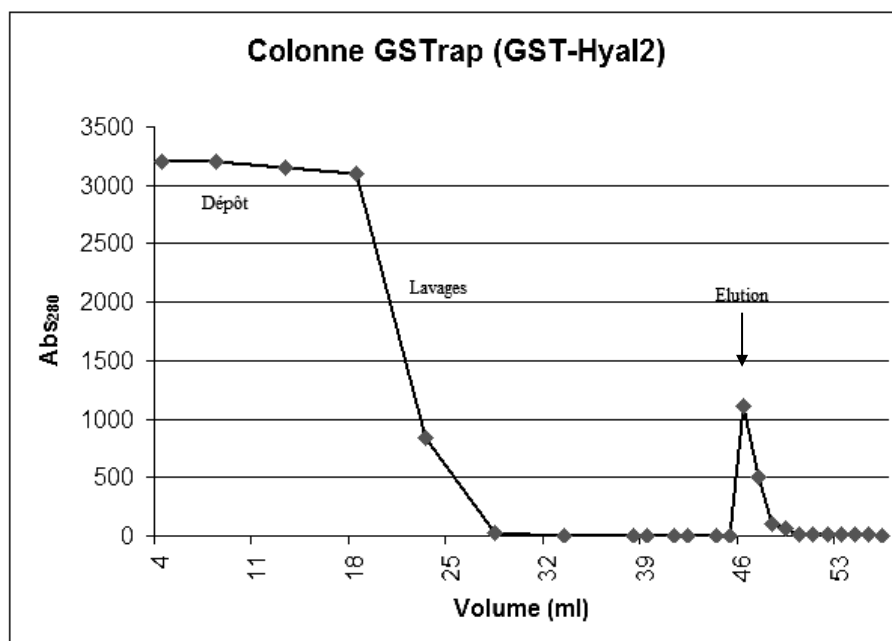
**Figures 4.13 a et b**

Analyse en Western blot de la purification, par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap avec clivage à la thrombine, de la protéine hyal2, au moyen de l'anticorps polyclonal anti-hyal2 (a) et de l'anticorps polyclonal anti-GST (b). NI = non induit. I = induit. D = dépôt de l'échantillon (effluent). L = lavages. T = clivage à la thrombine. E = élution au glutathion réduit.

Il semble ici légitime de chercher l'explication de la bande majoritaire située entre 50 et 75 kDa et qui se détache de la colonne après clivage à la thrombine. Nous avons raisonné qu'il pouvait s'agir d'une protéine ferment associée à GST-hyal2 et liée à la colonne par l'intermédiaire de la protéine de fusion, libérée lors du clivage à la thrombine. Ainsi, il arrive parfois que la protéine *DnaK* chez *E. coli* co-purifie avec les protéines recombinantes. Il s'agit d'une protéine impliquée dans la dégradation de protéines anormales. Nous avons tenté de nous en débarrasser en incubant le surnageant de lyse, préalablement au passage sur la colonne, avec 2 mM d'ATP, 10 mM de  $MgSO_4$  et 50 mM de Tris-HCl à pH 7,4, pendant 10 minutes à 37°C, mais en vain.

La quantité d'hyal2 libérée du tag GST restant toujours très faible, nous avons choisi de ne pas procéder au clivage à la thrombine, considérant qu'il serait toujours possible de comparer les résultats obtenus avec GST-hyal2 à ceux de la GST seule. Nous avons donc réitéré l'expérience en éluant directement la protéine de fusion au moyen de glutathion réduit.

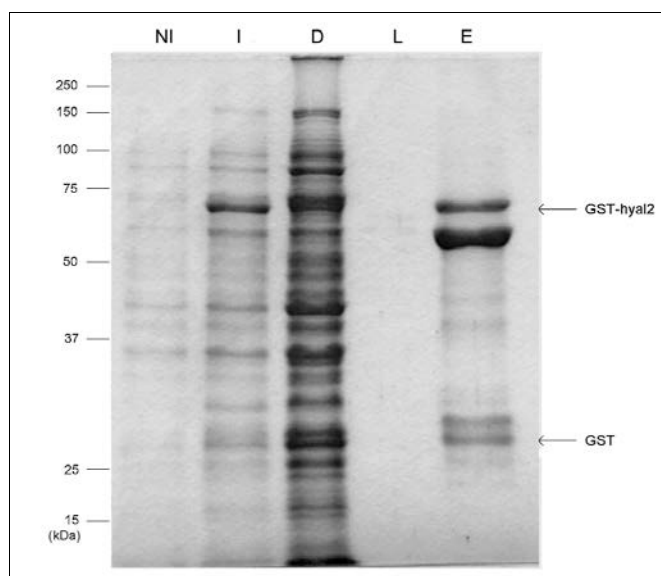
Une courbe de l' $A_{280}$  des fractions sortant de la colonne a été obtenue (**figure 4.14**).



**Figure 4.14**

Courbe de l' $A_{280}$  mesurée dans les différentes fractions recueillies à la sortie de la colonne, lors de la purification de GST-hyal2.

Les différents pics et vallées d'absorbance ont été analysés en SDS-PAGE avec coloration en bleu de Coomassie (**figure 4.15**) et en Western blot avec les anticorps anti-hyal2 et anti-GST(**figures 4.16 a et b**).



**Figure 4.15**

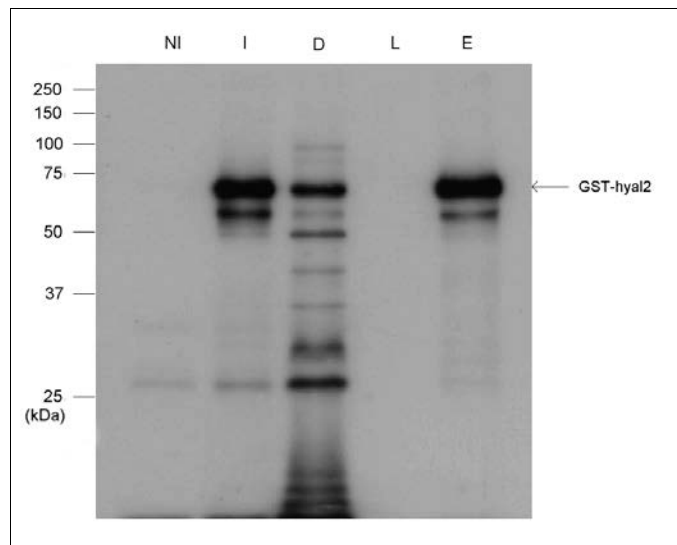
Analyse en SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie de la purification, par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap, de la protéine GST-hyal2. NI = non induit.

I = induit. D = dépôt de l'échantillon (effluent). L = lavages. E = élution au glutathion réduit.

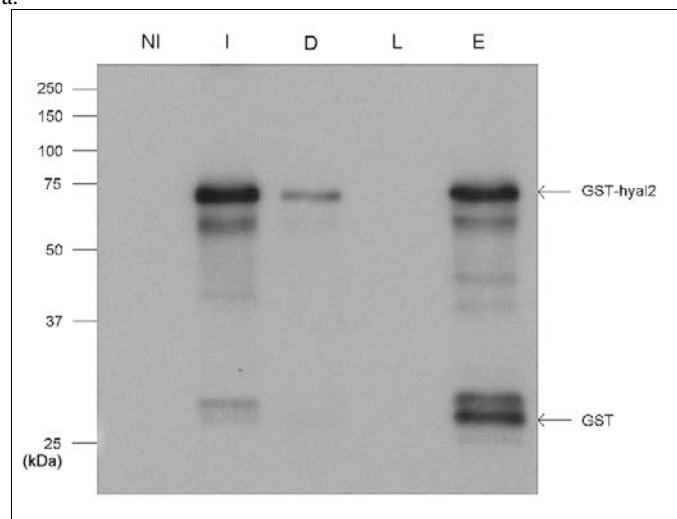
L'absence de clivage par la thrombine nous a permis d'augmenter le rendement de la purification. Une bande correspondant en effet à la taille attendue (environ 75 kDa) est bien visible sur le gel coloré au bleu de Coomassie et confirmée en tant que GST-hyal2 par les analyses en Western blot. Un doublet situé aux alentours de 26-27 kDa est apparent et reconnu par l'anticorps anti-GST. La signification de ce doublet n'est pas claire. La forme de plus petit poids moléculaire est visiblement la GST. La forme de plus grande taille correspondrait à la GST suivie d'un fragment d'hyal2, non détectable par l'anticorps anti-hyal2 dont l'épitope reconnu se situe dans la partie C-terminale d'hyal2. Nous pouvons observer que la bande parasite située aux alentours de 60-70 kDa est toujours présente. S'il s'agit d'une protéine chaperonne d'*E. coli*, elle pourrait être relâchée suite à une sonication trop importante. Nous avons dès lors tenté de réduire le temps de sonication en lysant partiellement les bactéries au moyen de lysozyme, préalablement à la sonication. La protéine parasite n'a cependant pas pu être éliminée.

Malgré ces difficultés, la probabilité que cette protéine parasite soit phosphorylable par la PKA étant substantiellement faible, nous avons choisi de poursuivre les manipulations aboutissant à l'obtention d'un appât pour le criblage, tandis que parallèlement étaient testées dans le laboratoire différentes techniques susceptibles d'améliorer la méthode de purification.

La quantité de protéine obtenue après purification a été estimée par comparaison, sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie, à différentes quantités d'albumine bovine d'un poids moléculaire de 66 kDa. Dans la fraction d'1 ml correspondant au pic d'élution, la concentration en protéine GST-hyal2 a été ainsi évaluée à 200 µg/ml.



a.



b.

**Figures 4.16 a et b**

Analyse en Western blot de la purification, par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap, de la protéine GST-hyal2, au moyen de l'anticorps polyclonal anti-hyal2 (a) et de l'anticorps polyclonal anti-GST (b). NI = non induit. I = induit. D = dépôt de l'échantillon (effluent). L = lavages. E = élution au glutathion réduit.

#### **4.4. Production et purification de la GST**

##### Mise au point des conditions d'induction

Ayant finalement choisi de ne pas éliminer le tag GST, le criblage de la banque doit être réalisé au moyen de la protéine hybride GST-hyal2 dans son intégralité. Il est dès lors essentiel de pouvoir discriminer les candidats relevant d'une interaction avec la partie hyal2 de ceux, inintéressants, qui s'associeraient avec la partie GST. Dans cet objectif, une partie du criblage est réalisée au moyen de la protéine encodée par le vecteur pGEX-2TK tel quel, c'est-à-dire la GST suivie du site de phosphorylation, permettant son marquage, et du site de clivage.

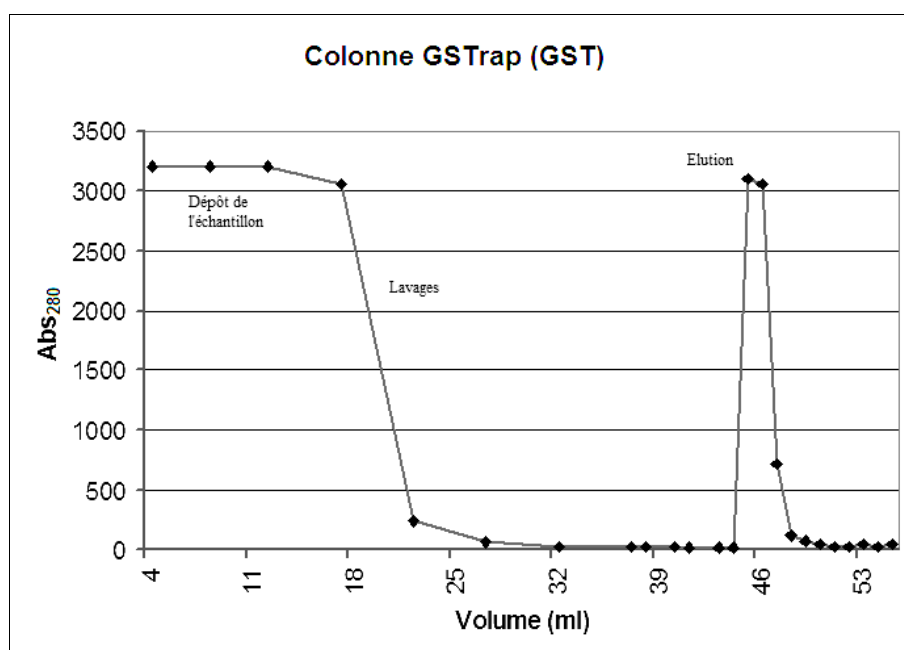
Le rendement de la purification de la GST s'est révélé bien supérieur à celui obtenu pour la protéine GST-hyal2. Nous avons donc utilisé les mêmes conditions que pour la production de GST-hyal2, c'est-à-dire 2 heures d'induction à 37°C et sous une concentration en IPTG de 0,1 mM.

##### Extraction des protéines

Pour l'extraction de la GST, nous avons suivi le protocole mis au point et utilisé pour la protéine GST-hyal2.

### Purification sur la colonne GSTrap FF

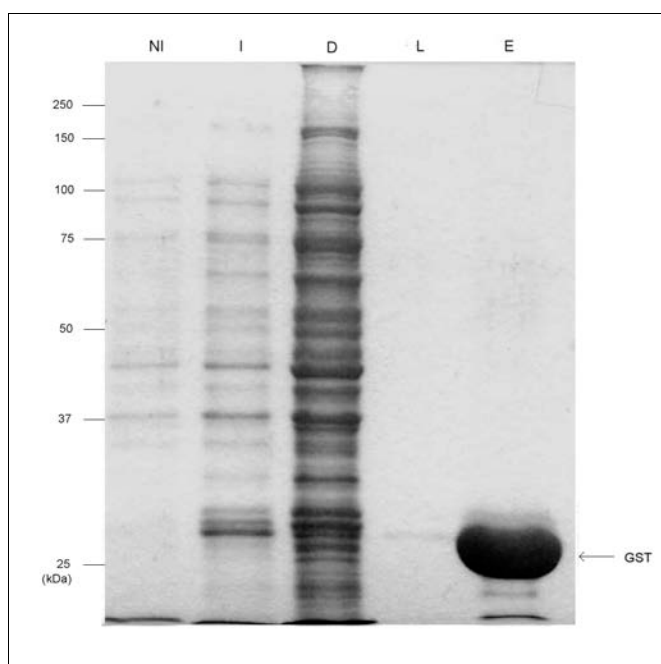
La purification par chromatographie d'affinité a été effectuée selon le même procédé que pour la protéine GST-hyal2, au moyen d'une nouvelle colonne GSTrap FF. La détermination de l' $A_{280}$  des fractions sortant de la colonne a permis l'obtention d'une courbe (**figure 4.17**).



**Figure 4.17**

Courbe de l' $A_{280}$  mesurée dans les différentes fractions recueillies à la sortie de la colonne, lors de la purification de la GST.

Les fractions d'intérêt ont été analysées en SDS-PAGE avec une coloration en bleu de Coomassie (**figure 4.18**) ainsi qu'en Western blot avec l'anticorps anti-GST (**figure 4.19**).



**Figure 4.18**

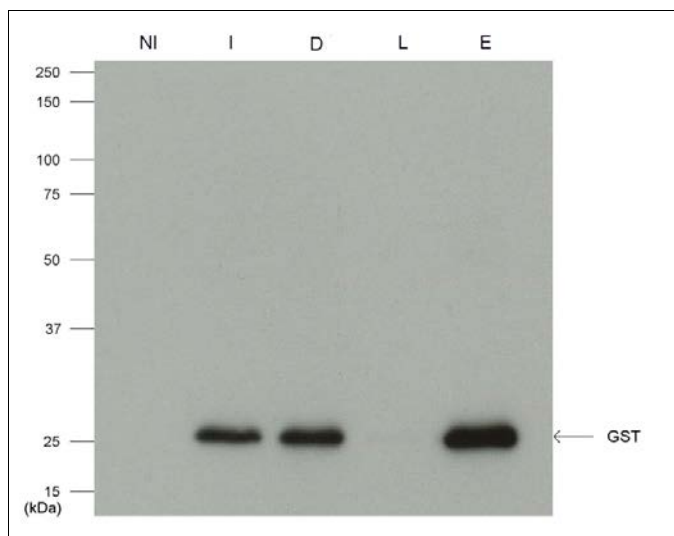
Analyse en SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie de la purification, par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap, de la protéine GST. NI = non induit.

I = induit. D = dépôt de l'échantillon (effluent). L = lavages. E = élution au glutathion réduit.

Lors de l'élution, on observe une bande très intense dont la taille correspond à celle attendue et est révélée par l'analyse en Western blot au moyen de l'anticorps anti-GST. Il s'agit donc très certainement de la GST.

Le rendement de la purification de la GST s'est révélé bien plus élevé que celui de la protéine recombinante GST-hyal2. Ce phénomène peut être expliqué, au moins en partie, par le fait que la résine est beaucoup plus rapidement saturée quand la taille de la protéine à purifier augmente (Frangioni & Neel, 1993).

La quantité de GST a été estimée, sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie, par comparaison avec différentes quantités d'anhydrase carbonique (d'un poids moléculaire de 29 kDa). La concentration en GST de la fraction correspondant au pic d'élution a été ainsi évaluée à 6 mg/ml.



**Figures 4.19**

Analyse en Western blot de la purification, par chromatographie d'affinité sur colonne GSTrap, de la protéine GST, au moyen de l'anticorps polyclonal anti-GST. NI = non induit. I = induit. D = dépôt de l'échantillon (effluent). L = lavages. E = élution au glutathion réduit.

## 5. PHOSPHORYLATION DES APPATS

La phosphorylation au moyen de PKA est une réaction délicate qui nécessite un bon contrôle des conditions dans lesquelles elle est réalisée. Au préalable, la fraction contenant la protéine purifiée dans un tampon à un pH égal à 8 contenant du glutathion réduit a été dialysée contre de l'eau stérile. Cette étape a permis de se débarrasser du glutathion et de revenir à un pH plus neutre afin de ne pas contrarier le bon déroulement de la phosphorylation.

60 µl de GST-hyal2, c'est-à-dire d'après nos estimations environ 12 µg de protéine, ainsi qu'1 µl de GST, c'est-à-dire environ 6 µg, ont été phosphorylés en présence de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . Après arrêt de la réaction, le volume des échantillons était de 1,2 ml pour GST-hyal2 et 200 µl pour la GST, ce qui représente respectivement 10 µg/ml et 30 µg/ml de protéine.

Après phosphorylation de la protéine GST-hyal2 et de la GST et élimination de l'ATP radioactif non incorporé, différentes aliquotes ont été prélevées pour le comptage des coups de Cerenkoff (**tableau 4.1**) ainsi que pour l'analyse sur gel de polyacrylamide avec révélation par autoradiographie (**figure 4.20**).



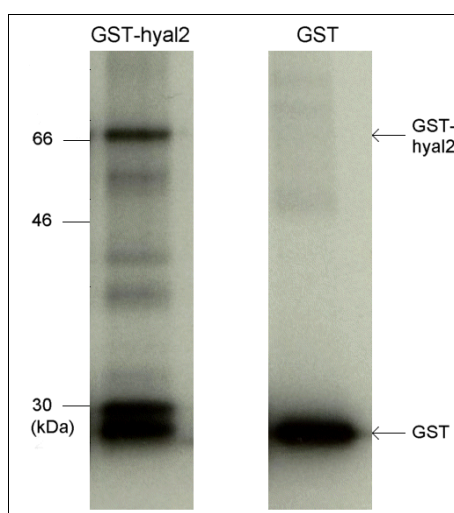
<b>GST-hyal2 (10 µg/ml)</b>	
Echantillon	Radioactivité (cpm)
Avant colonne	1 861 906
Eluat (1 <sup>ère</sup> fraction)	1 373 032

<b>GST (30 µg/ml)</b>	
Echantillon	Radioactivité (cpm)
Avant colonne	1 793 018
Eluat (1 <sup>ère</sup> fraction)	1 358 296

**Tableau 4.1**

Mesure du rayonnement  $\beta$  (en cpm) émis par des échantillons prélevés avant passage sur colonne "microspin Sephadex G-50" et dans la première fraction de l'éluat pour la protéine GST-hyal2 marquée au [ $^{32}\text{P}$ ] et pour la GST seule marquée au [ $^{32}\text{P}$ ].



**Figure 4.20**

Analyse en SDS-PAGE révélée par autoradiographie de la radioactivité émise par différents échantillons récoltés dans l'éluat pour la protéine GST-hyal2 marquée au [ $^{32}\text{P}$ ] et pour la GST seule marquée au [ $^{32}\text{P}$ ].

Le comptage indique une bonne incorporation du [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP. On observe une importante radioactivité au niveau de la protéine de fusion. La GST seule est également phosphorylée dans une proportion non négligeable.

Concernant le marquage de la GST, on observe une bande fortement radioactive en dessous de 30 kDa, ce qui correspond à la taille attendue.

---

## B. CRIBLAGE DE LA BANQUE D'EXPRESSION

---

### 1. CHOIX DE LA BANQUE

Dans le cas d'un criblage d'interactions directes entre protéines, il est important de choisir une banque permettant l'expression des ADNc par l'intermédiaire d'un promoteur. Ces banques, appelées banques d'expression, utilisent le plus souvent des phages du type  $\lambda$ gt11,  $\lambda$ Exlox et  $\lambda$ ZAP.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons choisi de cribler une banque d'ADNc d'embryon de souris au quinzième jour clonée dans le phage  $\lambda$ gt11 (Clontech). Le génome de  $\lambda$ gt11 contient un gène *lacZ* au sein duquel sont clonés, via un site unique *EcoRI*, les ADNc, obtenus par "random priming" ou "oligo(dT) priming" à partir d'une population d'ARN. De cette manière, les phages expriment ces ADNc, via le promoteur *lac*, inductible au moyen d'IPTG, en tant que protéines de fusion avec la  $\beta$ -galactosidase.

La souche d'*Escherichia coli* Y1090r est la souche de choix pour le criblage de banques d'expression clonées dans  $\lambda$ gt11. Elle contient, entre autres caractéristiques, un plasmide portant le gène *lacI<sup>q</sup>* permettant un contrôle très strict de l'expression des protéines dépendantes du promoteur *lac*. Sa déficience en protéase *lon* augmente en outre la stabilité des protéines produites.

Les bactéries doivent, préalablement à l'infection, être rendues compétentes. L'addition de maltose au milieu de culture permet d'augmenter l'adsorption des phages, via une induction de l'opéron maltose au sein duquel se situe le gène *lamB* encodant le récepteur membranaire du phage  $\lambda$ . Le  $Mg^{++}$ , ajouté sous forme de  $MgSO_4$ , facilite également l'adsorption des phages.

L'infection par les phages conduit à la lyse des bactéries, visible sur une boîte de Pétri sous forme de zones translucides disséminées sur un tapis bactérien opaque.

### 2. TITRAGE DE LA BANQUE

Un bon criblage est réalisé sur un échantillon représentatif de la banque. Ainsi, il est souvent nécessaire de cribler un million de clones pour couvrir l'ensemble du transcriptome à partir duquel est construite la banque. En pratique, un tel chiffre ne peut être atteint, si ce n'est en multipliant le nombre de boîtes, qu'en étalant la banque à une concentration élevée. Néanmoins, le contact entre les plages de lyse est à éviter car il est propice aux recombinaisons entre les clones de phage impliqués. Le titrage de la banque est donc indispensable afin de pouvoir étaler le nombre optimal de phages par boîte de Pétri. Le titrage permet aussi de s'assurer de la bonne qualité de la banque.

Le titrage a été effectué en infectant une souche Y1090r compétente, cultivée dans du LB additionné de maltose, puis resuspendue dans du  $MgSO_4$ , au moyen de différentes dilutions de la banque de phages, en étalant le tout sur des boîtes de 90 mm de diamètre recouvertes de

LB – Agar –  $\text{MgSO}_4$  et en laissant se développer les plages de lyse jusqu'à ce qu'elles soient dénombrables.

Quatre dilutions ont été réalisées et étalées chacune sur deux boîtes. Les plages de lyse ont été comptées sur plusieurs boîtes et une moyenne de 55 pfu/ml a été calculée en tenant compte de la dilution. Le titre de la banque a été évalué à  $1,375 \times 10^{10}$  pfu/ml, (une plage de lyse correspondant à un pfu). Ceci est un bon résultat car la banque est considérée comme représentative si son titre est supérieur à  $10^8$  pfu/ml. Un titre élevé garantit en outre une certaine stabilité de la banque au cours du temps.

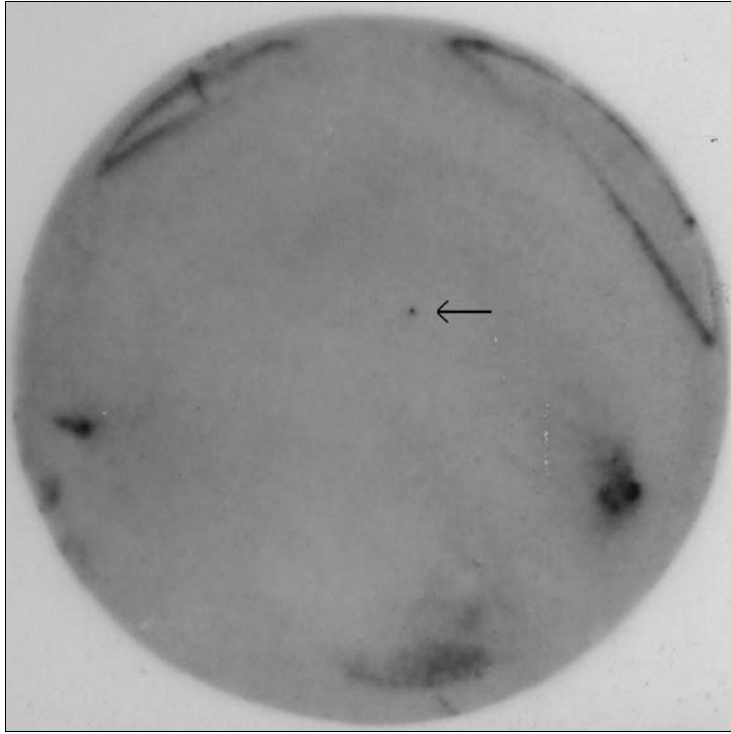
### 3. PREMIER TOUR DE CRIBLAGE

Le premier tour de criblage a été effectué sur dix boîtes de Pétri de 140 mm de diamètre. Pour chacune des boîtes, 1,2  $\mu\text{l}$  de la dilution 1/500 de la banque (contenant  $2,75 \times 10^6$  pfu/ml) ont été dilués dans 600  $\mu\text{l}$  de SM préalablement à l'infection des Y1090r. 33 000 pfu ont donc été étalés sur chaque boîte. Un total de  $3,3 \times 10^5$  pfu ont ainsi été criblés. Après une incubation de six heures à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à pouvoir visualiser les plages de lyse, les boîtes ont été recouvertes de membranes de nitrocellulose imprégnées d'IPTG et remises à  $37^\circ\text{C}$  pour la nuit.

Le lendemain, les membranes ont été retirées, bloquées pendant la journée puis incubées avec la protéine GST-hyal2 radioactive durant toute la nuit. L'appât GST-hyal2 a été dilué dans le milieu BB afin d'obtenir au final 250-300 000 cpm/ml, ce qui revient à une dilution de 1/2500 par rapport à notre échantillon de départ.

Le matin suivant, les membranes ont été lavées, séchées, disposées dans des cassettes d'autoradiographie et exposées à un film Kodak MS durant 24 heures à  $-80^\circ\text{C}$ .

Sur le film développé, différents spots positifs, représentant des partenaires potentiels, ont été relevés (**figure 4.21**). Grâce aux repères tracés sur les boîtes et les membranes, l'emplacement des clones positifs a pu être déterminé. Chaque clone a été prélevé en découpant une carotte à travers les couches de LB – Agar et de LB – Agarose au moyen d'un embout de pipette coupé, puis déposé dans un millilitre de SM. Les phages ont ensuite été placés à  $4^\circ\text{C}$  pendant la nuit afin de les laisser diffuser hors de l'agarose. Une goutte de chloroforme a été ajoutée à chaque tube pour une meilleure conservation des phages.



**Figure 4.21**

Révélation par autoradiographie de l'une des membranes du premier tour de criblage. La flèche indique un clone positif éventuel, repris pour être analysé lors d'un deuxième tour de criblage.

#### 4. SECOND TOUR DE CRIBLAGE

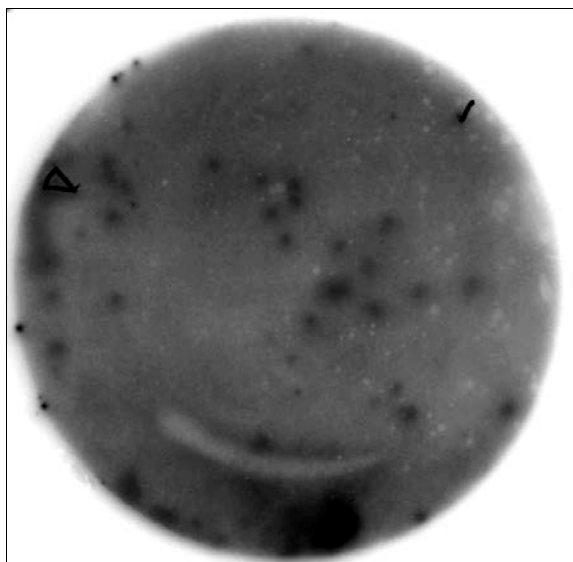
Lors du premier tour de criblage, les plages de lyse sont trop proches les unes des autres pour pouvoir prélever un clone unique. L'obtention de clones purs nécessite dès lors plusieurs tours de criblage.

Chaque échantillon prélevé lors du premier tour et resuspendu dans du SM a été réétalé en deux dilutions sur deux boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. En considérant qu'approximativement  $10^8$  pfu ont été prélevés et dissous dans 1 ml de SM, les deux dilutions réalisées,  $1/10^4$  et  $1/10^5$ , correspondent respectivement à environ  $10^4$  et  $10^3$  pfu/ml. Un volume de 100  $\mu$ l de chaque dilution a été étalé sur une boîte de 90 mm de diamètre recouverte de LB – Agar –  $MgSO_4$ . Après 6 heures d'incubation à 37°C, les boîtes arborant un nombre adéquat de plages de lyse (idéalement une centaine) ont été recouvertes de membranes de nitrocellulose imprégnées d'IPTG et replacées à 37°C pendant la nuit.

Le lendemain, les membranes ont été retirées, bloquées pendant la journée et incubées pendant la nuit avec la protéine GST-hyal2 radioactive, diluée dans le tampon BB à raison d'environ 250-300 000 cpm/ml.

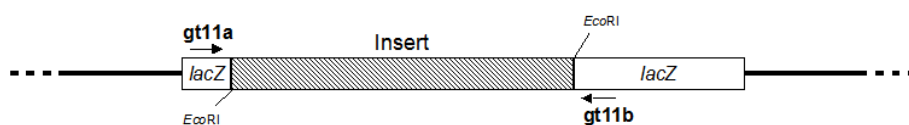
Le matin suivant, elles ont été lavées, séchées et exposées à un film Kodak MS durant un week-end entier à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La révélation du film a permis de mettre en évidence de nombreux spots radioactifs sur chacune des membranes (**figure 4.22**). Sur chaque boîte correspondante a été prélevé un clone positif. Ces différents clones ont été traités de façon identique à ceux du premier tour et conservés.



**Figure 4.22**

Révélation par autoradiographie de l'une des membranes obtenues lors du deuxième tour de criblage.



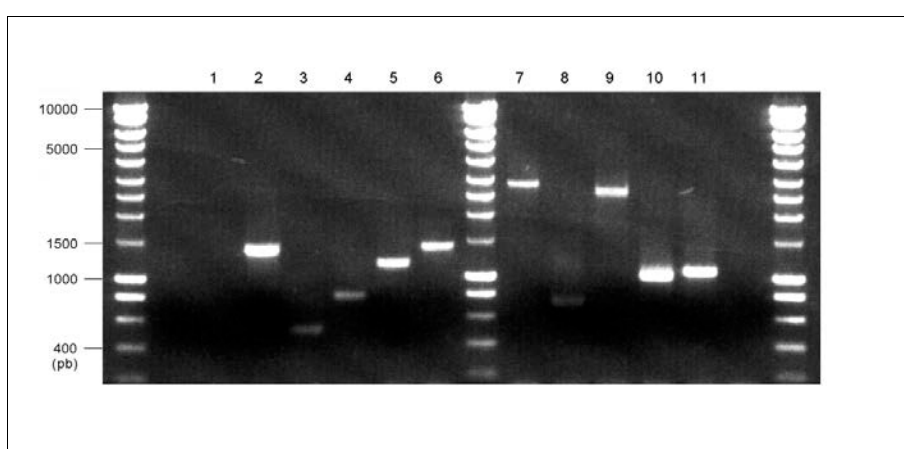
**Figure 4.23**

Représentation schématique de l'emplacement des amorces gt11a et gt11b.

Une PCR a été réalisée sur chaque candidat, au moyen de la polymérase Biotools, des oligonucléotides gt11a et gt11b (**figure 4.23**) et dans les conditions suivantes : 5 minutes de

dénaturation à 95°C, 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 55°C et 3 minutes d'élongation à 72°C, avec une élongation finale de 7 minutes à 72°C. Une étape d'élongation relativement longue est nécessaire étant donné que la taille des inserts à amplifier n'est pas connue et peut varier entre 500 et 4500 paires de bases, la moyenne se situant aux alentours de 1700 paires de bases.

La PCR a été analysée sur gel d'agarose 1% (**figure 4.24**). Les différents clones ont été pour la plupart amplifiés efficacement, l'analyse sur gel révélant pour chacun une bande unique, indiquant une population clonale, de taille variable d'un clone à l'autre. Seul le premier clone n'a pu être amplifié malgré plusieurs essais.



**Figure 4.24**

Criblage des colonies de phages positives au second tour. Les colonies sont indiquées par les numéros 1 à 11. Seule la colonie 1 n'a pu être amplifiée avec succès.

##### 5. TROISIEME TOUR DE CRIBLAGE

Le clivage à la thrombine, permettant d'éliminer le tag GST, n'a pas pu être effectué de manière efficace. Hyal2 n'a donc pas pu être libérée du tag GST. Pour cette raison, le criblage a dû être réalisé au moyen de la protéine de fusion GST-hyal2. Une étape supplémentaire a dès lors été requise: afin de pouvoir discriminer les partenaires s'accrochant à la GST de ceux qui interagissent avec hyal2, le troisième tour de criblage a été effectué d'une part au moyen de la protéine de fusion GST-hyal2 et d'autre part au moyen de la GST seule. De cette manière, les protéines interagissant avec hyal2 sont reconnaissables par le fait qu'elles ne s'associent pas à la GST seule.

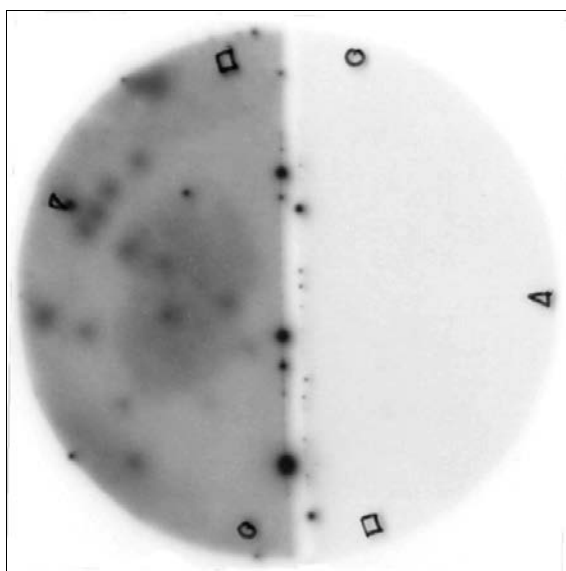
Chaque clone repiqué lors du deuxième tour a été étalé en deux dilutions ( $1/10^2$  et  $1/10^5$ ) sur des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre recouvertes de LB – Agar –  $MgSO_4$ . Après une incubation prolongée d'une nuit à 37°C, permettant de mieux visualiser les plages de lyse, des

membranes imprégnées d'IPTG ont été déposées sur les boîtes et le tout a été incubé à 37°C pendant trois heures supplémentaires.

Les membranes ont ensuite été retirées et bloquées pendant quatre heures. Elles ont été coupées en deux, une moitié de la membrane étant incubée avec la protéine GST-hyal2 radioactive, l'autre avec la GST seule, elle aussi marquée au [<sup>32</sup>P].

Le lendemain, les membranes ont été lavées, séchées et exposées à un film Kodak MS durant un week-end entier à -80°C.

Trois des dix clones se sont révélés positifs uniquement en présence de GST-hyal2, la demi-membrane incubée avec la GST seule étant vierge de tout signal (**figure 4.25**). Ces clones, numérotés 1, 3, et 8 exprimeraient donc des protéines interagissant avec hyal2.



**Figure 4.25**

Révélation par autoradiographie de l'une des membranes du troisième tour. La demi-membrane de gauche a été hybridée avec l'appât GST-hyal2 radioactif, la demi-membrane de droite avec la GST seule radioactive.

#### 6. ANALYSE DES CLONES POSITIFS

Les phages 3 et 8, positifs au troisième tour ont été une nouvelle fois amplifiés selon les mêmes conditions et leur produit de PCR, déposé sur gel d'agarose, en a été extrait et purifié. Chaque insert a été séquencé au moyen de l'amorce gt11a.

Une extraction de l'ADN du premier clone, non amplifiable par PCR, a été réalisée à partir de deux grandes boîtes de 140 mm de diamètre contenant 10<sup>5</sup> pfu chacune. Nous espérons

obtenir, à partir d'ADN purifié, un meilleur résultat quant à son amplification. Un produit de PCR a en effet pu être observé sur gel d'agarose 1%, mais représentait une quantité de matériel trop faible pour le séquençage. Nous avons choisi de le laisser en suspens.

Les séquences des clones 3 et 8 (**figure 4.26**) ont été soumises au programme blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Selon les résultats de cette recherche, le clone 3 encode la protéine ribosomale S14, tandis que l'ADNc présent dans le clone 8 dérive de l'ARN ribosomal 28s. La comparaison de la séquence peptidique de la protéine S14 et de celle de la protéine de fusion avec la  $\beta$ -galactosidase du phage a montré une continuité de phase entre le gène *lacZ* et l'ADNc de la protéine S14. En ce qui concerne l'ARN 28s, les banques d'ADNc sont souvent contaminées par une certaine quantité d'ARN ribosomaux. Clonés de la même manière que les autres dans le gène *lacZ* via le site *EcoRI*, on peut imaginer qu'ils puissent être traduits, via le promoteur *lac*, sous forme de peptides aberrants et éventuellement reconnus par l'appât. C'est en tout cas l'explication qui nous a paru la plus plausible.

**Clone 3 (Protéine S14)**

```
GCGGNCGCNTCNACGACGATCANGGAAACCATCTGCCGAGTGACTGGTGGGATGAAGGTGAAGGCTGACCGAGAT
GAGTCCTCTCCATATGCAGCCATGTTGGCTGCCAGGATGTGGCCAGAGGTGCAAGGAGTTGGGCATCACTGCC
CTGCACATCAAACTCCGGGCCACAGGAGGAAACAGGACCAAGACCCCTGGACCTGGAGCCAGTCAGCCCTCAGA
GCTCTTGCTCGCTCTGGGATGAAGATTGGGCGGATTGAGGATGTCACCCCATTCCTCTGATAGCACTCGAAGA
AAAGGGGGTCGTCGTGGTCGCCGTCTGTGAACAGGACTTCTCATTTTCTGTAAATAAATTGCTTTGTGTAAG
CTAAAAAAGTNNACCCGGCCNNAATTCANTTGANCNCCGGGGGTTCNCCATNNCCAATTGG
GNNNTNGGNAAAA
```

**Clone 8 (ARN ribosomal 28s)**

```
GAAGCATACCGTTACAGAAANNNTGNANTACACNNGNTTTTNNACAGTTACTGATACNGCTAATCACGGANCAA
GAGAACAACAACGAGCGACTGCCAAAAAAGTGCACTCGGGAGGCACGTGGCATGAACACTTGGACACCGCAG
ACNGGAGTGAAGNACTNGGNACTCTCCACCTCCCCAAAAAANGGAAACANCCCAAGGNAANNGC
CNTCGGGNGGNTTNGGNAAAAANCCGGNAANAAAAANNNNGGNGNTTNNGGCNTNCNNNGGAAAAA
```

**Figure 4.26**  
Résultat des séquences des clones 3 et 8.



## DISCUSSION

---

---

### A. BASES DU PROJET

---

Hyal2 est une enzyme de la famille des hyaluronidases, qui reste à l'heure actuelle mal connue. Elle est peu exprimée chez l'adulte, mais beaucoup plus durant la période embryonnaire. Les différentes études portant sur son activité enzymatique montrent que celle-ci est faible et n'est que partielle, hyal2 générant des fragments d'hyaluronane d'environ 20 kDa.

Hyal2 pourrait en outre jouer des rôles importants indépendamment de son activité enzymatique. Des observations récentes suggèrent un effet suppresseur tumoral.

Il est évident que l'identification de partenaires d'hyal2 permettrait une meilleure appréhension de ses fonctions. Deux interactions ont déjà été proposées, l'une avec la protéine WOX1 impliquée dans l'apoptose (Chang, 2002), l'autre avec RON, une tyrosine kinase membranaire impliquée dans la prolifération et la survie cellulaires (Danilkovitch-Miagkova *et al.*, 2003). Cependant, elles n'ont pas encore été examinées en détail. Une recherche de partenaires d'hyal2 à large échelle serait utile pour confirmer l'une de ces interactions ou pour en découvrir de nouvelles. Dans cette optique, le criblage d'une banque d'expression semble être une bonne approche. Nous avons opté pour un système de clonage par interactions. D'autres travaux portant sur hyal2 sont actuellement en cours dans des laboratoires américains; ils utilisent la technique du "double hybride membranaire" (Chang, *communication personnelle*).

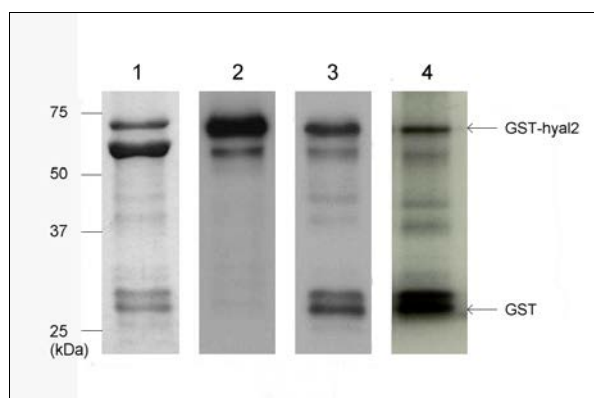
La technique de criblage choisie dans ce mémoire requiert l'obtention d'une protéine-appât purifiée. Pour cela, il fallait exprimer hyal2, au départ de son ADNc incorporé en plasmide, sous forme d'une protéine de fusion avec un tag qui permette la purification par chromatographie d'affinité. Nous avons décidé de supprimer les parties N-terminale (peptide signal) et C-terminale (partie hydrophobe destinée à être remplacée par l'ancre GPI) d'hyal2 afin d'éviter d'éventuelles interférences avec le trafic cellulaire lors de son expression, prévue en bactéries. La partie amplifiée d'hyal2 a été surnommée "core".

En première approche, nous avons choisi le vecteur d'expression pCAL-kc (Stratagene) afin de réaliser une protéine recombinante, résultant de la fusion du core d'hyal2 avec le CBP, dont la purification peut être réalisée par chromatographie d'affinité avec la calmoduline, et dont la phosphorylation est possible *in vitro* au niveau d'un site reconnu par la PKA. Il a cependant été impossible d'exprimer correctement cette construction dans la souche adéquate d'*E. coli*, malgré plusieurs essais et des contacts (infructueux) avec la firme. pCAL-kc a alors été abandonné au profit du vecteur pGEX-2TK (Amersham), plus documenté, permettant la fusion d'hyal2 avec la GST et encodant également un site de phosphorylation et un site de clivage à la thrombine pour l'élimination éventuelle du tag après purification.

## B. ETAPES DE LA REALISATION

La première difficulté rencontrée lors de l'expression de la construction GST-hyal2 a été sa tendance à s'accumuler en corps d'inclusion dans les bactéries sélectionnées (bien que le système GST soit censé prévenir cet inconvénient). Ceci a sérieusement réduit la quantité de protéine de fusion disponible pour la purification. Nous avons toutefois continué le projet au moyen de cette quantité réduite de protéine, car différentes techniques pour augmenter la proportion de protéine recombinante soluble (urée, guanidine, sarkosyl) n'ont pas apporté le succès escompté.

Néanmoins, il a été possible de produire suffisamment de GST-hyal2 dans la fraction soluble des bactéries soniquées pour l'accrocher à une colonne de glutathion-Sépharose et tenter de l'en décrocher par le clivage à la thrombine. Cependant, les résultats de ce clivage ont été décevants (cf. **figure 4.12**). La thrombine n'a permis de recueillir qu'une très faible quantité d'hyal2 séparée de la GST (le reste a probablement été dégradé) et l'élution de cette protéine purifiée s'est accompagnée d'un second produit immunoréactif avec les anticorps anti-hyal2 (il s'agit vraisemblablement d'une forme partiellement dégradée) ainsi que d'une grosse quantité d'un contaminant, non reconnu par les anticorps anti-hyal2 et anti-GST. Nous n'avons pas cherché à définir ou à isoler le contaminant. D'après son poids (60-70 kDa) et d'après les données de la littérature, nous imaginons qu'il puisse s'agir d'une protéine chaperonne endogène à *E. coli* dont la production augmenterait lors de l'expression de GST-hyal2. Selon la firme qui produit le vecteur, *DnaK*, une protéine située dans la bonne gamme de tailles (70 kDa), est capable de co-purifier avec certaines protéines de fusion. Comme ce contaminant se concentre fortement dans les éluats qui suivent l'action de la thrombine, nous imaginons qu'il a pu rester attaché à GST-hyal2 dans la colonne et être libéré en même temps qu'hyal2.



**Figure 5.1**

Purification et préparation de la protéine-appât GST-hyal2 phosphorylée (résumé des figures 4.15, 4.16 et 4.20). L'éluat au glutathion de la colonne d'affinité ayant lié GST-hyal2 est analysé: en SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (1), en Western blot avec l'anticorps anti-hyal2 (2), en Western blot avec l'anticorps anti-GST (3) et en autoradiographie après phosphorylation au  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (4).

Les trois dernières pistes ont été ajustées sur la première pour la clarté de la comparaison.

Un certain nombre de protéines contaminantes endogènes à *E. coli* peuvent être induites par une sonication trop importante, c'est pourquoi nous avons tenté de réduire la durée de sonication en incubant préalablement les bactéries avec du lysozyme ou de remplacer la sonication par un autre procédé de lyse, les cycles de congélation-décongélation. Aucune de ces manœuvres n'a permis de se débarrasser de la protéine parasite.

En ce qui concerne le clivage à la thrombine, plutôt que de se lancer dans des expériences d'ajustement de ses conditions d'action, dont la réussite n'est pas assurée, nous avons préféré poursuivre le but initial et nous diriger vers le criblage de la banque d'expression au moyen de la construction GST-hyal2 non clivée et non entièrement débarrassée de ses contaminants. La phosphorylation d'hyal2 sur le site artificiellement introduit lors de la construction devrait octroyer à l'appât une spécificité de détection suffisante. De plus, nous avons considéré qu'il serait possible de comparer les résultats du criblage avec GST-hyal2 à ceux d'un criblage avec la GST seule.

La purification de GST-hyal2 sans clivage à la thrombine (**figure 5.1**) a montré la présence de la protéine de fusion complète, du contaminant bactérien de 60-70 kDa ainsi que d'un doublet entre 25 et 30 kDa qui correspond à la GST vraisemblablement accompagnée d'une forme fortement tronquée de GST-hyal2. La présence de GST seule lors de la purification des protéines de fusion est souvent rapportée; elle s'expliquerait par une sensibilité accrue des protéines de fusion aux protéases. L'éluat contient probablement aussi des formes tronquées supplémentaires de GST-hyal2. L'étape de phosphorylation à la PKA a montré une bonne incorporation du [ $^{32}$ P] dans la protéine de fusion, mais aussi dans le doublet attribué à la GST.

L'appât pouvait donc être utilisé pour cribler la banque d'expression d'ADNc d'embryon de souris, en le comparant à la GST, elle aussi phosphorylée au [ $^{32}$ P].

---

## C. CRIBLAGE DE LA BANQUE

---

Environ 300 000 clones de phages ont été criblés lors de ce mémoire. Un premier tour a permis le repérage de candidats potentiels au moyen de l'appât GST-hyal2. Un deuxième tour a été nécessaire pour isoler les clones positifs. Le troisième tour, réalisé de façon comparative à l'aide de l'appât GST-hyal2 et de la GST seule, a permis de mettre en évidence trois clones dont les produits interagissent avec hyal2.

Ces clones ont été analysés. L'insert de deux d'entre eux a été amplifié et séquencé mais le troisième n'a pas pu être suffisamment amplifié. Nous n'avons cependant pas obtenu de partenaire significatif, puisque l'introduction des deux séquences dans le programme "blastn" a révélé, pour l'une une protéine ribosomale (S14) et pour l'autre un ARN ribosomal. Une interaction avec une protéine ribosomale n'a rien de spécifique; la découverte d'un ARN ribosomal laisse penser que l'appât a réagi avec un peptide aberrant formé à partir de la séquence de cet ARN ribosomal. La contamination des banques d'ADNc par des ARN non messagers est fréquente. Quoi qu'il en soit, de nouveaux criblages seront nécessaires pour

identifier des partenaires d'hyal2. De plus, un criblage complet, pour être significatif, doit être réalisé sur un million de clones.

---

#### D. CONCLUSION

---

Malgré les difficultés rencontrées pour obtenir un appât optimal, la démarche de criblage par interactions d'une banque d'expression a pu être menée à terme, au moyen de la protéine de fusion GST-hyal2. Aucun partenaire significatif n'a été découvert lors de ce criblage partiel.

L'obtention d'un meilleur appât, notamment par un clivage efficace à la thrombine, bénéficierait certainement à la poursuite du travail.

Si aucun clone positif significatif n'est obtenu après un criblage complet, nous pouvons envisager un cycle de dénaturation à l'urée suivi d'une renaturation des protéines immobilisées sur les membranes, afin de visualiser des interactions qui dépendraient de la structure tridimensionnelle.

L'obtention de clones positifs, quant à elle, devra être confirmée par d'autres méthodes, comme le GST-pulldown ou la co-immunoprécipitation.

## REFERENCES

---

- Amann, E., Brosius, J. & Ptashne M. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25**, 167-178 (1983).
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J. & Karin, M. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interaction. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3094-3102 (1997).
- Blackwell, J. R. & Horgan R. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* **295**, 10-12 (1991).
- Blackwood, E. & Eisenman, R. N. Max : a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with myc. *Science* **251**, 1211-1217 (1991).
- Blanar, M. A & Rutter, W. J. Interaction cloning : identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos. *Science* **256**, 1014-1018 (1992).
- Boulton, S. J., Vincent, S. & Vidal, M. Use of protein-interaction maps to formulate biological questions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 57-62 (2001).
- Chain, E. & Duthie, E. S. A mucolytic enzyme in testis extract. *Nature* **144**, 977-978 (1939).
- Chang, N.-S. Transformation growth factor- $\beta$ 1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase hyal-2 in L929 fibroblasts. *BMC Cell Biology* **3**, 8 (2002).
- Cherr, G. N., Yudin, A. I. & Overstreet, J. W. The dual function of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol.* **20**, 515-525 (2001).
- Csoka, A. B., Frost, G. I., Heng, H. H. Q., Scherer, S. W., Mohapatra, G. & Stern, R. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-3p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics* **48**, 63-70 (1998).
- Csoka, A. B., Scherer, S. W. & Stern, R. Expression analysis of paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* **60**, 356-361 (1999).
- Csoka, A. B., Frost, G. & Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* **20**, 499-508 (2001).
- Dahl, L. B., Dahl, I. M., Engström-Laurent, A. & Granath, K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* **44**, 817-822 (1985).
- Daly, M. C., Xiang, R. H., Buchhagen, D., Hensel, C. H., Garcia, D. K., Killary, A. M., Minna, J. D. & Naylor, S. L. A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppressor activity. *Oncogene* **8**, 1721-1729 (1993).
- Danilkovitch-Miagkova, A., Duh, F.-M., Kuzmin, I., Angeloni, D., Liu, S.-L., Miller, A. & Lerman, M. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and

mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4580-4585 (2003).

De las Heras, M., Barsky, S. H., Hasleton, P., Wagner, M., Larson, E., Egan, J., Ortin, A., Gimenez-Mas, J. A., Palmarini, M. & Sharp, J. M. Evidence for a protein related immunologically to the jaagsiekte sheep retrovirus in some human lung tumors. *Eur. Respir. J.* **16**, 330-332 (2000).

Dirks, C., Duh, F.-M., Rai, S., Lerman, M. & Miller, A. Mechanism of cell entry and transformation by enzootic nasal tumor virus. *J. Virol.* **76**, 2141-2149 (2002).

Dove, S. L., Joung, J. K. & Hochschild, A. Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. *Nature* **386**, 627-630 (1997).

Duran-Reynals, F. Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. *CR Séances Soc. Biol. Fil.* **99**, 6-7 (1928).

Einarson, M. B. & Orlinick, J. R. Identification of protein-protein interactions with glutathione-S-transferase fusion proteins. In: *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*. Golemis, E., CSHL Press, New York, pp 143-166 (2002).

Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).

Flamion, B., Mertens-Strijthagen, J. & Boël, P. Cloning of the cDNA for a rat hyaluronidase expressed in the kidney. *FASED J* **12**, A423 (1998).

Frangioni, J. V. & Neel, B. G. Solubilization and purification of enzymatically active Glutathione-S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210**, 179-187 (1993).

Frost, G. I., Csoka, T. B., Wong, T. & Stern, R. Purification, cloning and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 10-15 (1997).

Frost, G. I., Czoka, T. & Stern, R. The hyaluronidases : a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **8**, 419-434 (1996).

Gmachl, M. & Kreil, G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein in mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3569-3573 (1993).

Goodyear, C. S. & Silverman, G. J. Phage-display approaches for the study of protein-protein interactions. In : *Protein-Protein Interactions : A Molecular Cloning Manual*. Golemis, E., Ed. CSHL Press, New York, pp 143-166 (2002).

Hotez, P., Cappelo, M., Hawdon, J., Beckers, C. & Sakanari, J. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ankylostoma caninum* and *Anisakis simplex* : possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *J. infect. Dis.* **170**, 918-926 (1994).

Huang, W., Wang, S.-L., Lozano, G. & de Crombrughe, B. cDNA library screening using the SOS recruitment system. *BioTechniques* **30**, 94-100 (2001).

Hunnicut, G. R., Primakoff, P. & Myles, D. G. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional : one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm binding. *Biol. Reprod.* **55**, 80-86 (1996).

Joung, J. K. Identifying and modifying protein-DNA and protein-protein interactions using a bacterial two-hybrid selection system. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **37**, 53-57 (2001).

Kaelin, W. G. J., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blazar, M. A., Livingstone, D. M. & Flemington, E. K.

Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**, 351-364 (1992).

Laurent, T. C. & Fraser, J. R. E. Hyaluronan. *FASEB J* **6**, 2397-2404 (1992).

Lee, J. Y. & Spicer, A. P. Hyaluronan : a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 581-586 (2000).

Lepperdinger, G., Müllegger, J. & Kreil, G. Hyal2, less active but more versatile? *Matrix Biol.* **20**, 509-514 (2001).

Lepperdinger, G., Strobl, B. & Kreil, G. Hyal2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J. Biol. Chem.* **273**, 22466-22470 (1998).

Li, S., Kelly, S. J., Lamani, E., Ferraroni, M & Jedrzejewski, M. J. Structural basis of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase. *EMBO J.* **19**, 1228-1240 (2000).

Makrides, S. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512-538 (1996).

Margolis, B., Silvennoinen, O., Comoglio, F., Roonprapunt, C., Skolnik, E., Ullrich, A. & Schlessinger, J. High-efficiency expression-cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8894-8898 (1992).

Mayer, B. J., Jackson, P. K. & Baltimore, D. The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 627-631 (1991).

Mertens-Strijthagen, J., Boël, P., Lacreman, J. & Flamion, B. Hyal-2, a hyaluronidase expressed in the kidney, generates proinflammatory fragments of hyaluronan. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 533A (2000).

Meyer, K. & Palmer, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* **107**, 629-634 (1934).

Miller, A. D. Identification of hyal2 as the cell-surface receptor for JSRV and ONAV. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **275**, 179-199 (2003).

Müllegger, J. & Lepperdinger, G. Degradation of hyaluronan by a hyal2-type hyaluronidase affects pattern formation of vitelline vessels during embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* **111**, 25-35 (2002).

Natowicz, M. R., Short, M. P., Wang, Y., Dickersin, G. R., Gebhart, M. C., Rosenthal, D. I., et al. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **335**, 1029-1033 (1996).

Novak, U., Styli, S., Kaye, A. & Lepperdinger, G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res.* **59**, 6246-6250 (1999).

Posey, J. T., Soloway, M. S., Ekici, S., Sofer, M., Civantos, F., Duncan, R. C. & Lokeshwar V. B. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (hyal1) for prostate cancer. *Cancer Res.* **63**, 2638-2644 (2003).

Primakoff, P., Hyatt, H. & Myles, D. G. A role for the migrating sperm surface antigen, PH-20, in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell. Biol.* **101**, 2239-2244 (1985).

Rai, S., Duh, F.-M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M. & Miller, A. Candidate tumor suppressor hyal2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc. Natl. Am. Sci. USA* **98**, 4443-4448 (2001).

Reboul, J., Vaglio, P., Rual, J. F., Lamesch, P., Martinez, M., Armstrong, C. M., Li, S., Jacotot, L., Bertin, N., Janky, R., Moore, T., Hudson, J. R. J., Hartley, J. L., Brasch, M. A., Vandenhaute, J., Boulton, S., Endress, G. A., Jenna, S., Chevet, E., Papasotiropoulos, V., Tolias, P. P., Ptacek, J., Snyder, M., Huang, R., Chance, M. R., Lee, H., Doucette-Stamm, L., Hill, D. E. et Vidal, M. C. elegans ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nat. Genet.* **34**, 35-41 (2003).

Ron, D. & Dressler, H. pGSTag – A versatile bacterial expression plasmid for enzymatic labelling of recombinant proteins. *BioTechniques* **13**, 866-869 (1992).

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular cloning, a laboratory manual* (Second Ed.). Ed. CSH Laboratory Press, New York (1989).

Seidman, C. E. & Struhl, K. Introduction of plasmid DNA into cells. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & sons, 1.8.1-1.8.10 (1997).

Serebriiskii, I. & Joung, J. K. Yeast and bacterial two-hybrid selection systems for studying protein-protein interactions. In: *Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual*. Golemis, E., Ed. CSHL Press, New York, pp. 93-142 (2002).

Sharom, F. J. & Lehto, M. T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 535-549 (2002).

Shibata, T., Shimoyama, Y., Gotoh M. & Hirohashi, S. Identification of human cadherin-14, a novel neurally specific type II cadherin, by protein interaction cloning. *J. Biol. Chem.* **272**, 5236-5240 (1997).

Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S. & Hayashi, H. Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 996-1001 (2002).

Sidhu, S. S. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 610-616 (2000).

Sikela, J M. & Hahn, W. E. Screening an expression library with a ligand probe : isolation and sequence of a cDNA corresponding to a brain calmodulin-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3038-3042 (1987).

Skolnik, E. Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A. & Schlessinger, J. Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell* **65**, 83-90 (1991).

Smith, D. B. & Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* **67**, 31-40 (1988).



Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).

Stofko-Hahn, R. E., Carr, D. W. & Scott, J. D. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **302**, 274-278 (1992).

Stone J. M. Phage-based expression cloning to identify interacting proteins. In: *Current Protocols In Protein Science*. John Wiley & sons, 19.3.1-19.3.3 (1999).

Takayama, S. & Reed, J. C. Protein interaction cloning by Far-Western Screening of  $\lambda$ -phage cDNA expression libraries. *Methods Mol. Biol.* **69**, 171-184 (1997).

Takayama, S., Takaaki, S., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A. & Reed, J. C. Cloning and functional analysis of BAG-1 : a novel Bcl-2 binding protein with anti-cell death activity. *Cell* **80**, 279-284 (1995).

Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523-533 (2003).

Triggs-Raine, B. S., Salo, T. J., Zhang, H., Wicklow, B. A. & Natowicz, M. R. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigen family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6296-6300 (1999).

Van Moer, K. Rôle de l'ancre glycosylphosphatidylinositol dans le trajet intracellulaire de l'hyaluronidase hyal2. *Mémoire de licence en sciences biologiques*, FUNDP (2002).

Vanrenterghem, B., Morin, M., Czech, M. P. & Heller-Harrison, R. A. Interaction of insulin receptor substrate-1 with the  $\sigma$ 3A subunit of the adaptor protein complex-3 in cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 29942-29949 (1998).

West, D. C. & Kumar, S. Hyaluronan and angiogenesis. In: *The biology of hyaluronan*. Evered, D. & Whelan, J., Eds John Wiley and sons, Chichester, 187-207 (1989).

Wilkinson, D. L. & Harrison, R. G. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *BioTechnology* **9**, 443-448 (1991).

Yudin, A. I., Li, M.-W., Robertson, K. R., Cherr, G. N. & Overstreet, J. W. Characterization of the active site of monkey sperm hyaluronidase. *Reproduction* **121**, 735-743 (2001).

Zheng, C.-F., Simcox, T., Xu, L. & Vaillancourt, P. A new expression vector for high level protein production, one step purification and direct isotopic labeling of calmodulin-binding peptide fusion proteins. *Gene* **186**, 55-60 (1997).

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
A. L'HYALURONANE ET LES HYALURONIDASES	2
1. L'ACIDE HYALURONIQUE OU HYALURONANE	2
1.1. Structure	2
1.2. Historique	3
1.3. Localisation chez les mammifères	3
1.4. Fonctions	3
2. LES HYALURONIDASES: VUE D'ENSEMBLE	3
2.1. Historique et classification	3
2.2. Hyaluronidases eucaryotes	5
2.3. Organisation génomique des hyaluronidases	6
3. APERÇU DES HYALURONIDASES DE MAMMIFERES	6
3.1. Hyal1	6
3.2. PH-20	7
3.3. Hyal3	7
3.4. Hyal4	7
3.5. Hyalp1	7
4. HYAL2	8
4.1. Introduction	8
4.2. Localisation	8
4.3. Activité	9
4.4. Expression	9
4.5. Autres fonctions potentielles	9
4.6. Partenaires connus	10
B. PRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES RECOMBINANTES CHEZ LES PROCARYOTES	12
1. INTRODUCTION	12
2. STRUCTURE D'UN VECTEUR D'EXPRESSION	12
2.1. Le promoteur	12
2.2. Initiation et terminaison	14
2.3. Sélection et multiplication	14
3. SYSTEMES DE BALISAGE DES PROTEINES	15
C. ETUDE DES INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE	16
1. INTRODUCTION	16
2. DOUBLE HYBRIDE	17

3.	<i>CO-IMMUNOPRECIPITATION</i>	18
4.	<i>RECHERCHE DE PARTENAIRES PAR CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'EXPRESSION</i>	19
5.	<i>PHAGE DISPLAY</i>	20
<b>BUTS DU MEMOIRE</b>		<b>21</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>		<b>22</b>
A.	<b>CONSTRUCTIONS</b>	22
1.	<i>POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)</i>	22
2.	<i>PURIFICATION D'ADN</i>	23
3.	<i>RESTRICTIONS</i>	23
4.	<i>LIGATION</i>	23
5.	<i>CULTURE DE BACTERIES</i>	23
6.	<i>PRODUCTION DE BACTERIES ELECTROCOMPETENTES</i>	24
7.	<i>ELECTROTRANSFORMATION</i>	24
8.	<i>CONSERVATION DES BACTERIES</i>	24
9.	<i>MAXI-PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE</i>	24
10.	<i>DOSAGE D'ADN</i>	24
11.	<i>SEQUENÇAGE</i>	24
B.	<b>PRODUCTION DE LA PROTEINE HYAL2</b>	25
1.	<i>INDUCTION</i>	25
2.	<i>EXTRACTION DES PROTEINES</i>	25
3.	<i>PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE</i>	26
4.	<i>DOSAGE DES PROTEINES</i>	26
5.	<i>ANALYSE DES RESULTATS</i>	27
C.	<b>CRIBLAGE D'UNE BANQUE D'ADNC EXPRIMEE EN PHAGE λGT11</b>	27
1.	<i>SOLUTIONS</i>	27
2.	<i>PHOSPHORYLATION DE L'APPAT</i>	28
3.	<i>PREPARATION DE LA BANQUE</i>	29
3.1.	<i>Préparation des bactéries</i>	29
3.2.	<i>Titration de la banque</i>	29
3.3.	<i>Criblage de la banque</i>	30
4.	<i>EXTRACTION D'ADN DE PHAGES</i>	31
<b>RESULTATS</b>		<b>33</b>

A.	PREPARATION DE L'APPAT	33
1.	CHOIX DE L'APPAT	33
2.	CHOIX DU VECTEUR	34
3.	LE VECTEUR PCAL-KC	34
3.1.	Présentation du vecteur et principe du système CBP	34
3.2.	Construction de pCAL-kc-hyal2	36
3.3.	Inductions	36
3.4.	Conclusion	37
4.	PGEX-2TK	37
4.1.	Description du système GST et du vecteur pGEX-2TK	37
4.2.	Construction de pGEX-2TK-hyal2	40
4.3.	Production et purification de la protéine recombinante GST-hyal2	44
4.4.	Production et purification de la GST	52
5.	PHOSPHORYLATION DES APPATS	55
B.	CRIBLAGE DE LA BANQUE D'EXPRESSION	57
1.	CHOIX DE LA BANQUE	57
2.	TITRAGE DE LA BANQUE	57
3.	PREMIER TOUR DE CRIBLAGE	58
4.	SECOND TOUR DE CRIBLAGE	59
5.	TROISIEME TOUR DE CRIBLAGE	61
6.	ANALYSE DES CLONES POSITIFS	62
	DISCUSSION	64
A.	BASES DU PROJET	64
B.	ETAPES DE LA REALISATION	65
C.	CRIBLAGE DE LA BANQUE	66
D.	CONCLUSION	67
	REFERENCES	68

Secrétariat du Département de Physiologie et Pharmacologie  
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.43.29 – Téléfax: +32(0)81.72.43.29  
E-mail: Bruno.Flamion@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## Recherche de partenaires de l'hyaluronidase Hyal2

JADIN Laurence

### Résumé:

Hyal2 est une enzyme de la famille des hyaluronidases, qui dégraderait l'hyaluronane de haut poids moléculaire en fragments de 20 kDa. Il s'agit d'une protéine encore mal connue. L'objectif de ce travail est d'aider à la compréhension de la fonction d'hyal2 par la recherche d'éventuels partenaires avec lesquels elle pourrait interagir. Sachant qu'elle est davantage exprimée chez l'embryon que chez l'adulte, cette étude a été réalisée par criblage d'une banque d'expression d'ADNc d'embryon de souris clonée dans le phage  $\lambda$ gt11. L'appât utilisé pour le criblage a été constitué d'hyal2 fusionnée à un tag GST. La protéine de fusion a été produite en bactérie puis purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine glutathion-Sépharose et phosphorylée à l'aide de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  au niveau d'un site artificiel reconnu par la protéine kinase A. Le criblage de ~300 000 clones de phages ne nous a pas permis d'identifier de partenaire significatif d'hyal2. La technique devra être répétée jusqu'à couvrir l'ensemble de la banque criblée.

Mémoire de licence en Sciences biologiques  
Juin 2003

**Promoteur:** B. Flamion

**Copromoteur:** J. Mertens-Strijthagen

*Après les six mois consacrés à ce mémoire, je tiens beaucoup à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue et qui m'ont apporté leur aide, de quelque manière que ce soit, pour réaliser ce travail.*

*Je remercie plus particulièrement M. Flamion pour son accueil et pour son appui tout au long de cette année et de ce mémoire.*

*Un tout grand merci également à Mme Mertens pour tous les conseils avisés qu'elle a pu me prodiguer. Merci aussi à Marie pour son aide inestimable dans la purification des protéines, à Catherine d'avoir partagé avec moi son expérience des criblages de banques de phages et à Marielle qui a été ma complice durant ce dur combat.*

*Je remercie encore Cécile, Guy, Mme Lacremans, Mme Daelman, Kris et Carlos pour leur enthousiasme et la chaleureuse ambiance du laboratoire qui m'a permis d'y travailler avec beaucoup de plaisir.*

*Merci aussi à toute l'équipe de l'URPHYM.*

*Je tiens à remercier Isabelle Hamer, M. Toussaint, M. De Bolle et M. Van Cutsem d'avoir accepté de lire ce mémoire.*

*Je ne pourrais oublier, pour terminer cette liste de remerciements, ma famille, grâce à qui j'ai toujours pu garder le moral même dans les moments difficiles, mes amis pour les bons moments que j'ai passé avec eux et Richard pour sa patience et tout simplement sa présence.*

## TABLE DES ABREVIATIONS

A	Adénine
A <sub>280</sub>	Absorbance à 280 nm
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
ATP	Adenosine tri-phosphate
BB	Binding buffer
BSA	Bovine serum albumine
C	Cytidine
CBP	Calmodulin-binding peptide
cpm	coups par minute
Da	Dalton
DO <sub>600</sub>	Densité optique à 600 nm
dT	déoxythymine
DTT	Dithiothréitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EGF	Epidermal growth factor
ENTV	Enzootic Nasal Tumor Virus
EST	Expressed sequence tag
G	Guanine
GFP	Green fluorescent protein
GPI	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
GST	Glutathione-S-transferase
HBB	Hepes blocking buffer
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'[2-ethanesulfonic acid]
HRP	Horse-radish peroxidase
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D –galactopyranoside
JSRV	Jaagsiekte sheep retrovirus
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LB	Luria-Bertani
M	Molaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mCi	Millicurie
mM	Millimolaire
mmol	Millimole
ONAV	Ovine Nasal Adenocarcinoma Virus
pb	Paire de base

PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pfu	Plaque-forming unit
PKA	Protein Kinase A
PS	Peptide signal
rpm	Rotations par minute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SM	Suspension medium
T	Thymine
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor $\beta$ 1
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
Tris-HCl	Forme acide du tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
U	unité
v/v	Volume/volume
WOX1	WW domain-containing oxidoreductase